45 B

АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

MICROBIOLOGY

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XIII. ВЫП. 4

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1944

МИКРОБИОЛОГИЯ

Ответственный редактор чл.-корр. Академии Наук СССР Б. Л. Исаченко

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

А. Ф. Войткевич, А. А. Имшенецкий,
Я. И. Раутенштейн, В. Л. Рыжков, В. О. Таусон,
Ф. М. Чистяков, В. Н. Шапошников

MICROBIOLOGY

EDITORIAL BOARD:

A. F. Woitkewich, A. A. Imšenecki,
B. L. Issatchenko (Editor), J. I. Rautenstein,
V. L. Rischkov, W. O. Tausson, F. M. Tchistiakov,
W. N. Schaposchnikov

Адрес редакции: Москва, 71 Б. Калужская, 33,
Институт микробиологии Академии Наук СССР

ВЛИЯНИЕ ВНЕШНИХ УСЛОВИЙ НА УКСУСНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ

И. Л. Работнова

Введение

Более 100 лет назад (в 1823) Шюценбахом было предложено производство уксуса по скорому способу. До сих пор это производство существует в первоначальном виде, хотя способ этот очень несовершенен. Для рационализации производства необходимо хорошо знать физиологические свойства уксусных бактерий. В большинстве случаев соответствующие исследования проводились с культурами в колбах, и лишь единичные и далеко не исчерпывающие исследования были проведены в производственных или близких к ним условиях.

Влияние концентрации кислорода на потребление кислорода в аппарате Варбурга изучалось Виландом и Берто (Wieland u. Bertho [11]). По их данным, концентрация кислорода не влияет на скорость его потребления.

Аналогичные данные получены Оппенгеймером (Oppenheimer [9]) при изучении влияния аэрации на работу заводского образователя. Он нашел, что интенсивность аэрации очень мало отражается на производительности бактерий. Однако Вюстенфельд (Wüstenfeld [12]) в руководстве по уксусному производству показывает, что бактерии не реагируют заметным образом на сокращение аэрации только в том случае, если изменять ее очень постепенно. На неосторожное уменьшение тока воздуха бактерии часто отвечают резким сокращением производительности.

Детальные исследования физиологии уксусных бактерий в условиях, близких к производственным, очень желательны для установления путей рационализации производства. Кроме того, они представляют и некоторый теоретический интерес. Дело в том, что бактерии, укрепившись на стружках, осуществляют процесс непрерывного брожения. Исследований физиологических свойств бактерий в условиях непрерывного брожения пока очень мало.

Культуры

Из образователей завода имени X Октября было выделено 20 штаммов уксуснокислых бактерий. Культуры выделялись из одной колонии. Чистота культур проверялась многократными высевами на чашки с сусловым агаром.

Все культуры исследовались на максимальное образование уксусной кислоты; из них 7 культур оказались наиболее активными, способными образовывать 9—10% кислоты. Для дальнейшей работы были выбраны 2 штамма — 14_6 и 15_3.

Культура 14_6 выделена из образователя, дающего не менее 9% кислоты и работающего при 35°. Под микроскопом она представляет собой палочки 1—1,5 × 2—2,8 μ, часто соединенные по 2 и более. Колонии на сусло-агаре коричневатые, с гладким краем, блестящие. Со временем поверхность делается радиально исчерченной. Пленка на сусле очень тонкая, немного всползает на стенки, среда мутится, позже муть исчезает. На среде Геннеберга с аммонийным азотом растет хорошо. На сусле с 4,6 и 8% спирта вырастает соответственно через 4, 6 и 8 дней. С 10% спирта

Printed in Soviet Union

рост начинается через 15 дней. При содержании в среде до 5% кислоты «переокисляет», т. е. окисляет образовавшуюся уксусную кислоту до CO_2. Выше 5% переокисления нет.

Культура 15_3 так же выделена из образователя, дающего кислотность не менее 9%. Изогнутые или прямые палочки 0,5—0,7 × 1,0—2,5 μ, часто по 2. Колонии слизистые, коричневатые, с прозрачным краем. Часто можно видеть дочерние колонии. На сусле образуется белая пленка, очень легко тонущая. Мути нет. На сусле с 4% спирта вырастает на 6-й день, с 6%—на 9-й, с 8%—на 16-й, с 10%—на 24-й. Переокисляет при концентрации уксусной кислоты до 5%. Выше 5% переокисления нет.

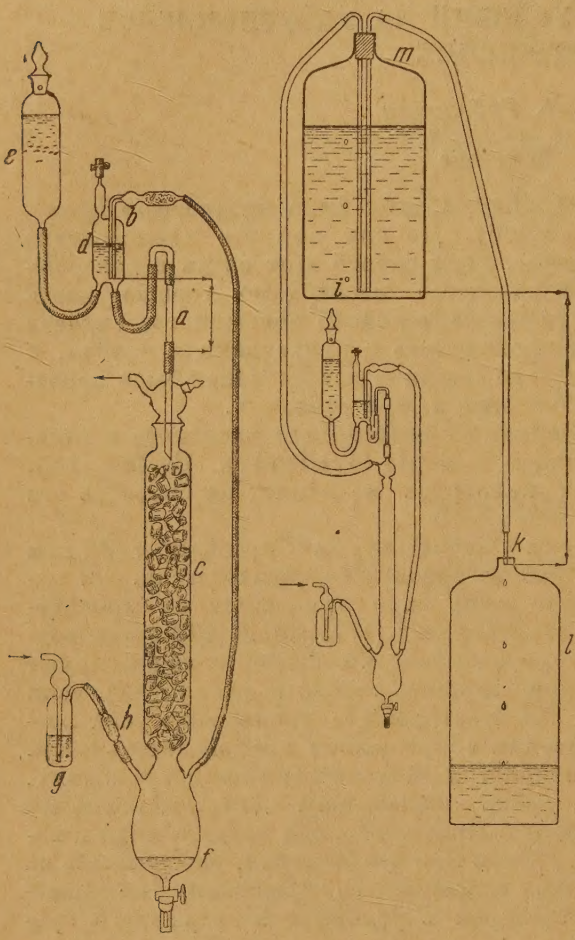

Рис. 1. Аппарат для наблюдений над уксуснокислым брожением

c — образователь со стружками; *a* — капилляр, подающий затор; *d* — сосудик с затором; *b* — капилляр, впускающий воздух; *e* — сосудик с запасным затором; *f* — резервуар для слива; *g* — прошивалка для входящего воздуха; *h* — фильтр для воздуха; *m* — аспиратор; *k* — капилляр, регулирующий скорость истекания воды из аспиратора

Было также испытано кислотообразование на различных углеводах, причем оказалось, что кислотообразование на дрожжевой среде с добавкой различных углеводов очень слабое, за исключением глюкозы.

На основании всех полученных данных исследуемые культуры можно идентифицировать как B. curvum или B. Schüzenbachii. Более точная идентификация оказалась невозможной, так как оба исследуемых вида несколько отличались и от B. curvum и от B. Schüzenbachii, описанных в руководстве Геннеберга, по степени подкисления на различных углеводах. Это обстоятельство лишний раз показывает, что систематика уксусных бактерий скорого способа неудовлетворительна. Повидимому, разные авторы имеют в руках различные разновидности одного, в сущности, вида, не вполне сходные с теми, которые описаны в основном руководстве Геннеберга. Для отнесения бактерий к виду curvum или Schüzenbachii не всегда оказывается достаточно оснований.

Методика

Для изучения физиологических свойств бактерий в условиях непрерывного брожения был сконструирован специальный аппарат, построенный по типу заводского образователя. Прибор изображен на рис. 1. Бактерии расселяются на буковых стружках, закатанных так же, как это делается на заводе, только значительно меньшего размера, или на коротких отрезках фарфоровой трубки. Стружки или фарфор могут равномер-

но орошаться питательной средой в количестве от 5 до 70 см³ в сутки. Скорость подачи среды регулируется разностью уровней жидкости в капилляре *a* и трубке *b*. Аэрация совершается непрерывно при помощи аспиратора. Количество протягиваемого воздуха можно изменять от 3—5 до 28—30 л в сутки. Аэрация регулируется разностью уровней жидкости и в капилляре *k* и трубке *i*. Объем стружек или фарфора 440 см³. Опыты велись в стерильных условиях. Для расселения бактерий на стружки, пропитанные питательным раствором, вносилась сусловая культура. 1—2 дня прибор находился в покое, затем начинались заливка и аэрация. В большинстве случаев на стружках бактерии расселялись быстро и через 3—4 дня начинали энергично окислять спирт. В некоторых случаях, однако, окисление спирта начиналось через 1—2 мес. На фарфоре, как правило, окисление спирта начиналось не раньше как через 40 дней.

Состав среды

$(NH_4)_2 SO_4$	0,1 г
$MgSO_4$	0,1 »
K_2HPO_4	0,1 »
$(NH_4)_2 HPO_4$	0,2 »
Уксусная кислота	53—55 г
Спирт	45 см³
Сусло 16°	20—30 см³
Водопроводная вода	1 л

Количество сахара в среде составляло 0,3—0,5% при пересчете на мальтозу. Ежедневно определялось количество кислоты в сливающейся жидкости титрованием 1 см³ 0,1*N* щелочью. Испарение спирта в аппаратах достигало до $^1/_8$ — $^1/_{10}$ общего количества при аэрации 12 л в сутки и заливке 50—60 см³. Аппараты находились в термостате при 28—30°.

Производительность бактерий, расселенных на фарфоре, значительно меньшая, чем на стружках. На стружках образуется до 3 г и более уксусной кислоты в сутки. На фарфоре производительность не превышает 0,8 г, в некоторых аппаратиках 0,45 г. Это объясняется, повидимому, тем, что бактерии плохо прикрепляются к фарфору. Обе исследуемые культуры, 14_6 и 15_3, в одинаковой степени легко смываются с фарфора и в сливе всегда содержится большое количество бактерий, так что при посеве на чашки неразведенного слива вырастает такое большое количество колоний, что их нельзя сосчитать. Ввиду этого количество заливки на фарфор давалось меньшее, чем на стружки. Через образователи с фарфором ежесуточно пропускалось 20—30 см³ жидкости. Через образователи со стружками — около 60 см³.

Результаты опытов

I. Влияние аэрации на производительность бактерий

Интенсивность аэрации оказывает очень сильное влияние на производительность бактерий. Резкое сокращение аэрации сильно снижает производительность, иногда почти останавливает работу. Далее, в течение нескольких дней восстанавливается первоначальная интенсивность работы.

На рис. 2 видно, что сокращение аэрации с 10—12 л в сутки до 5—6 ведет к резкому сокращению производительности. Между тем сокращение аэрации до 5 л при наблюдавшейся в опытах производительности (2 г кислоты) еще не ведет к острому недостатку кислорода, необходимого для окисления соответствующего количества спирта, так как для этого требуется всего 3,75 л воздуха.

Такая чувствительность к изменению внешних условий очень затруд-

няла работу, так как всякая случайная задержка в аэрации выводила образователь из строя на несколько дней.

На уксусных заводах в летнее время нередко наблюдаются перебои в работе образователей. Это обычно объясняют перегревом образователя. При работе уксусных бактерий образователи нагреваются, и если наружный воздух не будет достаточно прохладным, то температура может подняться до 40°, и работа бактерий приостанавливается.

Аэрация в образователях осуществляется той естественной тягой, которая образуется вследствие разности температур внутри и снаружи. Естественно, что если разность температур невелика, то тяга ослабляется. Весьма вероятно, что это обстоятельство является не менее важной причиной перебоев в работе, чем высокая температура.

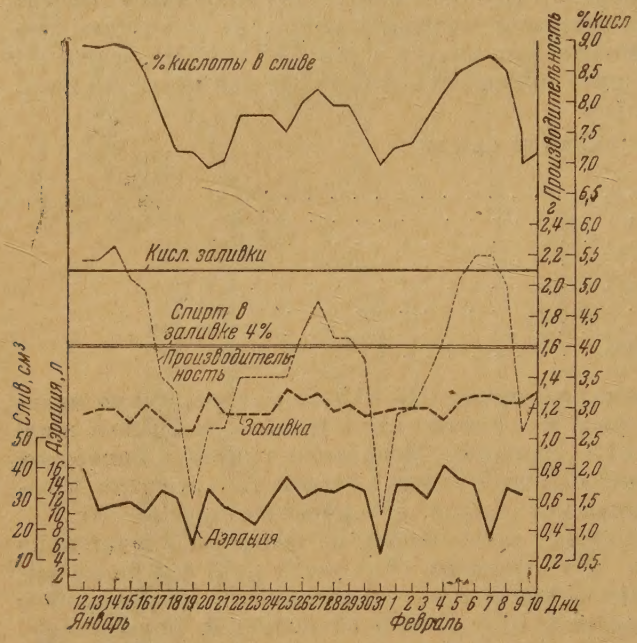

Рис. 2. Образователь со стружками. Культура 14.

Поэтому возможно, что искусственная подача кислорода или воздуха в образователь в жаркие дни могла бы улучшить работу уксусного завода.

Если резкое снижение аэрации, которое само по себе не ведет к нехватке кислорода, сильно сказывается на производительности уксусных бактерий, то естественно ожидать, что и резкое увеличение количества протягиваемого воздуха вызовет такой же эффект. Действительно, опыты показывают, что увеличение количества протягиваемого воздуха с 14—16 л в сутки до 26 л (в среднем) ведет к резкому и длительному снижению производительности.

Так как с увеличением аэрации увеличивается испарение, то в первый момент бактериям могло нехватать спирта. Чтобы избежать этого, количество спирта в заливке было увеличено с 4,5 до 5%. Это само по себе не влияет на производительность бактерий (см. ниже). Недостатка в спирте не наблюдалось; в сливе содержалось до 2% спирта.

При повторении опыта с другим образователем, заселенным той же культурой, был получен аналогичный результат.

Характер снижения производительности от резкого увеличения аэрации отличается от того, что наблюдается при уменьшении аэрации. Работа бактерий замирает на 15—20 дней и лишь потом постепенно восстанавливается.

Таким образом можно заключить, что резкое увеличение и резкое уменьшение количества протягиваемого воздуха нарушают равномерную работу уксусных бактерий.

Для учета количества бактерий, смывающихся со стружек, производились посевы 0,1 см³ слива на чашки Петри с сусловым агаром. Культура 15_3 часто давала обильный рост.

При этом обнаружилась следующая закономерность: в моменты интенсивной работы бактерии почти не вымываются, в моменты замедления начинается массовый вынос бактерий со стружек.

На рис. 3 приведена производительность образователя, заселенного культурой 15_3. Производительность сильно колебалась в связи с неравномерной аэрацией. Падения производительности, изображенные на графике, объясняются задержкой в аэрации.

Во многих случаях при посеве 0,1 см³ на чашках получался сплошной рост, и подсчитать колонии не было возможности. В этих случаях количество бактерий на графике отмечалось как превосходящее 10000 клеток в 1 см³. Кривая количества бактерий является точным зеркальным отражением кривой производительности. Таким образом, способность бактерий прикрепляться к стружкам связана с их окислительной деятель-

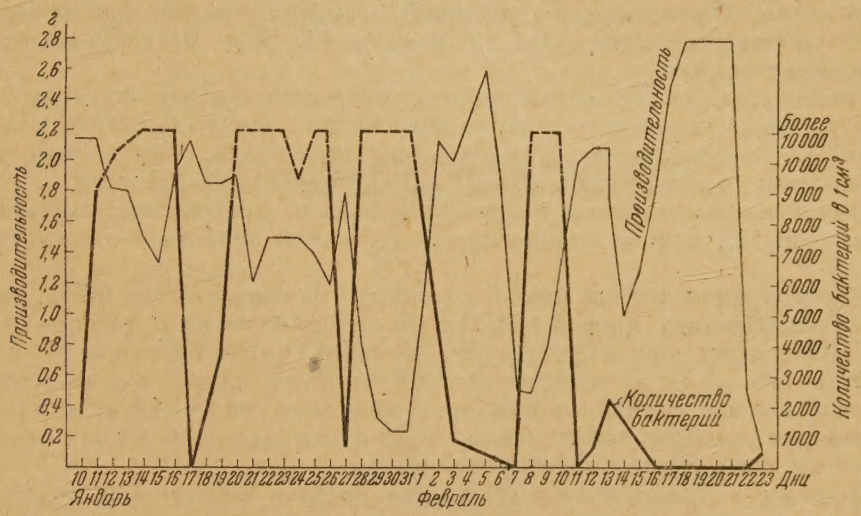

Рис. 3. Образователь со стружками. Культура 15_3

ностью. Каким образом осуществляется эта связь — пока не ясно. Повидимому с этим же явлением имел дело Геннеберг (Henneberg [6]), когда указывал, что при нормальной работе в сливе нет бактерий, а у «больных» образователей их легко выделить из слива.

Культура 14_6 прикрепляется к стружкам прочнее, чем 15_3. Она начинает вымываться только при почти полной остановке работы бактерий.

II. Влияние состава среды на производительность уксусных бактерий

Влияние состава среды на интенсивность окисления спирта изучалась различными авторами при культивировании бактерий в колбах, а также в производственных условиях.

Перольд (Perold [10]), Геннеберг (Henneberg [7]), Виланд и Берто (Wieland u. Bertho [11]), Мантейфель, Зыкова и Дульман [4] изучали влияние различных концентраций спирта и уксусной кислоты на культуры различных видов уксусных бактерий. Эти исследования показали, что уксусные бактерии переносят значительные количества спирта и кислоты, в особенности бактерии скорого способа B. curvum и B. Schüzenbachii,

При постепенном добавлении спирта к культурам последних двух видов они способны доводить концентрацию уксусной кислоты до 14%. Количество спирта, при котором еще возможно его окисление, также очень велико: 8—9%.

Влияние различных солей на кислотообразование в культурах уксусных бактерий (B. acetigenum) изучал Креган (Krehan [8]) и нашел, что $Ca^{\cdot\cdot}$, $Mg^{\cdot\cdot}$, $H_2PO'_4$ и Cl' усиливают образование кислоты, а $K^{\cdot}$ $Na^{\cdot}$ и SO''_4 — подавляют.

Анненков [1] изучал влияние различных смесей минеральных веществ и глюкозы на образование кислоты из спирта при культивировании бактерий в особых приборчиках на стружках, но без непрерывного поступления свежей среды. Расселение бактерий происходит в этих приборчиках 2—2,5 мес. Данные Анненкова показывают, что добавление глюкозы (450—1800 г на 100 л перерабатываемого абсолютного спирта, т. е. в среде в среднем 0.07%) увеличивает производительность.

Иерусалимский и Мантейфель [3] изучали в производственных условиях влияние состава среды на производительность. При этом оказалось, что при повышении кислотности заливки до 11,1—11,4% производительность стала в 3 раза меньше, чем при 6%. Добавление зольных элементов в ничтожном количестве — 0,1 г/л и сусла 12° Балг. 0,5 см³/л повышает производительность.

Наши исследования посвящены выяснению влияния концентрации спирта и уксусной кислоты в среде на производительность бактерий. Работа велась с образователями, наполненными стружками. Ежесуточно через образователь пропускалось 60—70 см³ питательного раствора.

Влияние концентрации спирта изучалось в образователе, заселенном культурой 14_6, влияние концентрации уксусной кислоты — с культурой 15_3.

Концентрация того и другого вещества изменялась на 0.5%, после этого наблюдалась производительность образователя в течение более или менее длительного промежутка времени. Опыты тянулись 97 и 108 дней. За это время производительность бактерий сильно колебалась из-за всевозможных случайных причин, и чаще всего из-за нарушений режима аэрации, которые происходили ночью или в выходной день и поэтому не могли быть своевременно исправлены.

Поэтому в таблицах приведены лишь средние величины за более или менее длительные промежутки времени.

Таблица 1

Влияние концентрации спирта на производительность. Образователь со стружками. Культура 14_6

Количество спирта в заливке в %	Длительность наблюдения в днях	Общая производительность в г	Средняя производительность за 1 день в г
4,0	16	23,96	1,50
4,5	8	15,10	1,88
5,0	13	26,28	2,02
5,5	16	21,12	1,32
5,75	6	7,88	1,31
6,0	13	13,69	1,05
6,5	20	0	0

Таблица 2

Влияние концентрации уксусной кислоты на производительность. Образователь со стружками. Культура 15_3

Количество уксусной кислоты в заливке в %	Длительность наблюдения в днях	Общая производительность в г	Средняя производительность за 1 день в г
5,34	14	22,77	1,62
5,95	13	32,86	2,53
6,58	13	14,95	1,15
7,32	32	24,01	0,75
7,83	5	0,14	0,03
7,54	10	0	0

При изменении концентрации спирта от 4 до 6% существенных изменений в производительности не наблюдалось. При концентрации 6,5% работа продолжалась с прежней интенсивностью в течение 8 дней, затем произошло случайное снижение аэрации до 3 л в сутки. Работа остановилась и больше не возобновлялась. Оптимальной концентрацией при данной заливке оказалось 5% спирта. При 6.5% работа бактерий угнетается.

При изменении концентрации уксусной кислоты от 5,3 до 6,0% производительность держалась на наивысшем уровне, достигая в некоторые периоды 3 г и более в сутки. При повышении концентрации до 7,3% про-

изводительность снизилась в среднем до 0,75 г и держалась на этом уровне в течение 32 дней. При дальнейшем повышении концентрации кислоты до 7,83% работа бактерий остановилась совершенно и не возобновилась при снижении крепости уксуса до 7.54%.

Таким образом, при заливке 60—70 см³ ежедневно, что соответствует 40 л на производстве (по расчету на величину сечения образователя), оптимальная концентрация спирта равняется 5%, а кислоты 6%.

Далее исследовалась потребность уксусных бактерий в углеводах. Для быстрейшего расселения бактерий на стружках и, в особенности, на фарфоре оказалось необходимым добавление в заливку сусла в количестве 2—3%. После того как образователи начинали равномерно работать, определялось количество сахара, потребляемое бактериями. Сахар определялся по Бертрану (с пересчетом на мальтозу) в заливаемой среде и в сливе. Результаты опытов приведены в табл. 3.

Таблица 3

Использование сахара при окислении спирта (определение по Бертрану, пересчет на мальтозу)

Дата	Культура	Материал, на котором рассеяны бактерии	Слив в см³	Производит. уксусной кислоты в г	Количество сахара в среде в г	Количество сахара в сливе в г	Использовано сахара в г	Использовано сахара в %	Использовано сахара на образование 1 г CH_3COOH
26/X	14_6	Стружки	65	1,19	0,487	0,463	0,024	5,2	0,0200
23/XII	14_6	»	35	0,32	0,207	0,204	0,003	1,4	0,0090
1/IV	14_6	»	60	2,23	0,236	0,226	0,010	4,2	0,0047
21/XII	15_3	»	68	2,81	0,243	0,220	0,023	9,4	0,0082
23/XII	15_3	»	68	3,15	0,243	0,180	0,063	26,0	0,0200
23/III	15_3	Фарфор	35	0,88	0,144	0,139	0,005	3,5	0,0060
25/III	15_3	»	25,5	0,79	0,105	0,087	0,018	17,0	0,0228

На образование 1 г уксусной кислоты используется от 5 до 23 мг сахара. Количество сахара, используемого бактериями, невелико по сравнению с тем, которое добавлялось в среду, и составляет не более 26% при самой энергичной работе.

По данным Иерусалимского [2], наиболее активная окислительная деятельность уксусных бактерий происходит в период размножения клеток. Энергичное размножение клеток происходит лишь на средах с углеводами, причем последние потребляются бактериями. Этим и объясняется потребление глюкозы на единицу образовавшейся уксусной кислоты. Таким образом, усиление питания ведет к повышению образования уксусной кислоты.

При объеме стружек образователя в 440 см³ производительность достигает 3 г в сутки. При пересчете на объем стружек среднего заводского образователя — 1,13 см³ (Иерусалимский и Мантейфель [3]) это соответствует 7—8 кг. Между тем на заводах производительность 1,5—2 кг считается хорошей. Высокая производительность в лабораторных образователях, несомненно, объясняется высоким содержанием питательных веществ в заливке, и, следовательно, активным размножением бактерий.

В заводских условиях на один образователь дают 2—3 г сахара (Иерусалимский и Мантейфель). Это количество является недостаточным, если принять в расчет, что по нашим данным на 1 г уксусной кислоты потребляется по крайней мере 5 мг сахара. Увеличение количества питательных веществ (углеводов) в заводской заливке приведет к повышению производительности при условии предохранения от развития посторонней микрофлоры.

Мы задались вопросом: является ли сусло, содержащее азотистые вещества, более благоприятным источником питания, чем чистая глюкоза.

Велись наблюдения над производительностью образователей, наполненных стружками и фарфором, заливаемых средой с суслом, а затем с равноценным количеством глюкозы. Результаты приведены на табл. 4.

Таблица 4

Влияние замены сусла равноценным количеством глюкозы на производительность уксусных бактерий; культура 15_3

Наполнители	Дополнительное питание	Длительность наблюдения в днях	Средняя суточная заливка в $см^3$	Средняя суточная производит. CH_3COOH
Стружки	30,5% глюкозы . . .	37	63	1,55
	2% сусла (0,36% мальтозы)	28	65	1,90
Фарфор	0,36% глюкозы . . .	12	27	0,63
	2% сусла (0,36% мальтозы) . . .	31	25,5	0,67

Опыты показали, что при заливке средой с суслом производительность выше, чем с глюкозой, но незначительно.

Таким образом, глюкоза является вполне пригодным источником питания для уксусных бактерий.

Велись опыты по изучению влияния изменения концентрации сусла на производительность уксусных бактерий. При этом использовались образователи, наполненные фарфором, так как они не впитывают в себя большого количества жидкости и смена состава среды может быстро оказывать свое действие на бактерии. При этом выяснилось, что уменьшение количества сусла в среде, еще ни в какой мере не ведущее к нехватке сахара, снижает производительность уксусных бактерий (табл. 5). Это обстоятельство заставляет предполагать, что среда орошает фарфор неравномерно. Очевидно, она стекает струйками, и большая ее часть не приходит в соприкосновение с бактериями. Бактерии, следовательно, могут использовать лишь некоторую часть всей заливаемой среды. Это обстоятельство не дало возможности изучить влияние низких концентраций сусла на производительность бактерий.

Однако удалось установить тот факт, что внезапное увеличение концентрации сусла от 0,9 до 3% и, следовательно, увеличение осмотического давления более чем в 3 раза не нарушают деятельности уксусных бактерий, таких чувствительных ко всяким изменениям внешних условий. Результаты этих опытов представлены в табл. 5. Концентрация сусла постепенно снижалась, до тех пор пока это не стало тормозить работу. Затем концентрация сусла сразу была повышена. Производительность при этом начала немедленно возрастать, никакого ослабления работы в связи с резким изменением состава среды не наблюдалось.

III. Диссоциация уксусных бактерий

Культура 14_6 образует крупные, правильной формы, блестящие колонии. Она поддерживалась на сусловом агаре со спиртом. Пересевы производились 1 раз в месяц в течение $1^1/_2$ лет. При многократных высевах на чашки всегда сохранялся первоначальный вид колоний. При наблю-

Таблица 5

Влияние изменения количества сусла в заливке на производительность уксусных бактерий

Культура	Длительность в днях	Количество заливки в см³	Сусло в среде в %	Сахар в среде в %	Количество сахара в заливке в мг	Средняя производительность за 1 день в г	Максимальное количество использов. сахара в мг*
14_6	8	24	3	0,425	102	0,40	9
	12	24	1,8	0,255	61	0,23	5,5
15_3	25	22,5	2	0,36	81	0,46	10,5
	12	28	0,5	0,09	25	0,19	4,4
	11	18	3	0,425	77	0,47	10,4
14_6	27	21	1	0,14	30	0,29	6,8
	14	24	3	0,425	102	0,46	10,7
14_6	6	22	3,0	0,425	94	0,30	6,9
	5	19	2,5	0,355	67	0,38	8,7
	3	22	2,1	0,300	66	0,44	10
	5	20	1,9	0,270	54	0,42	9,7
	4	20	1,6	0,227	45	0,45	10,3
	8	20	1,3	0,184	37	0,39	9
	6	22	1,1	0,155	34	0,44	10,1
	9	19	0,9	0,127	24	0,26	6
	15	20	3,0	0,425	85	0,51	11,7

* Из расчета 23 мг на 1 г образующейся CH_3COOH.

дении колоний, вырастающих из слива образователей, было замечено, что наряду с гладкими, блестящими колониями вырастают матовые, с неровным краем и шероховатой поверхностью. Образователи были простерилизованы и заражены вновь, так как было предположено, что культура загрязнилась. Однако появление матовых колоний в сливе наблюдалось опять и опять. Так же колонии были обнаружены и при высеве исходной культуры из старых колбочек с суслом. В то же время исходная культура, поддерживаемая на агаре, давала только блестящие колонии. Стало несомненно, что мы имеем дело с диссоциацией культуры на S и R-формы, с которыми имела дело и Шапинская [5]. Оба типа колоний были изолированы и поддерживались на сусловом агаре со спиртом. Характер колоний оставался постоянным. Один образователь со стружками был заселен гладкой формой. Некоторое время из слива вырастали только гладкие колонии, но спустя месяц стали появляться матовые колонии.

Связи между количеством блестящих и матовых колоний в сливе и интенсивностью работы бактерий замечено не было.

При исследовании максимального кислотообразования у сбоих штаммов бактерий были получены следующие результаты (табл. 6).

Таблица 6

Кислотообразование у гладких и складчатых форм уксусных бактерий

Культура	Длительность опыта в днях	Максимальная конечная кислотность в %
Гладкие колонии . .	33	6,69
» » . .	33	5,70
Матовые колонии . .	34	6,87
» » . .	34	6,52

Существенных различий в кислотообразовании у обоих типов бактерий не оказалось.

Выражаю глубокую благодарность проф. В. Н. Шапошникову, А. Я. Мантейфель и Н. Д. Иерусалимскому за ряд советов и указаний по ходу работы.

Выводы

Изучались физиологические свойства уксуснокислых бактерий скорого способа в условиях непрерывного брожения в специально сконструированных аппаратах. Бактерии расселялись по поверхности буковых стружек и на обрезках фарфоровых трубок. При этом выяснилось:

1. Интенсивность аэрации оказывает сильное влияние на производительность бактерий (количество образованной уксусной кислоты в сутки). Резкое ослабление или усиление аэрации приостанавливает работу бактерий иногда на несколько дней.

2. Снижение интенсивности работы бактерий сопровождается массовым вымыванием бактерий со стружек. При хорошей работе в сливе почти не содержится бактерий. С фарфора бактерии смываются при всех условиях.

3. При изучении влияния содержания спирта и уксусной кислоты на производительность бактерий установлено, что при заливке 60—70 $см^3$ в сутки (что соответствует 40 л на производстве) оптимальная концентрация спирта 5%, кислоты 6%.

4. Добавление сахара к заливке сильно повышает производительность бактерий. Бактерии потребляют от 5 до 20 мг сахара на образование 1 г уксусной кислоты. При этом производительность достигает 7—8 кг (в пересчете на объем стружек заводского образователя).

5. Сусло не представляет особых преимуществ по сравнению с глюкозой при наличии в заливке аммонийных солей.

7. Резкое изменение концентрации сусла в заливке не влияет на производительность бактерий.

6. В образователе происходит диссоциация уксусных бактерий на S- и R-формы, различающиеся между собой по виду колоний. Существенных различий в кислотообразовании у обоих типов бактерий не оказалось.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 23. IX. 1942

ЛИТЕРАТУРА

1. Анненков М. Г. Применение чистых культур и изучение условий дополнительного питания в уксусном производстве. Консультации по бродильной промышленности Укр. ин-та пищевой пром., в. 9, 1939.
2. Иерусалимский Н. Д. Связь между кислотообразованием и развитием уксусных бактерий. Микробиология, т. VIII, вып. 2, стр. 160, 1939.
3. Иерусалимский Н. Д., Мантейфель А. Я. Условия окислительной работы уксусообразователя. Сб. научно-исслед. работ Сектора органических кислот. Наркомпищепром, 1940.
4. Мантейфель А. Я., Зыкова К. М., Дульман Т. М. Выделение и изучение штаммов уксусных бактерий. Сб. научно-исслед. работ Сектора органических кислот. Наркомпищепром, 1940.
5. Шаинская. Диссертация. Рукопись 1939 г.
6. Henneberg. W. Bakteriologische Untersuchungen in der Schnellessigfabrik u. s. w., Cbl. Bakt., II, Abt., B. 16, 551, 1906.
7. Henneberg W. Handb. der Gärungsbakteriologie, B. I, 1926.
8. Krehan M. Beitr. zur. Physiologie und Systematik der Essigbakterien. Arch. Mikrob., B. II, 1931.
9. Oppenheimer W. Stoffwechselbilanz der Essiggärung, Dtsch. Essigind., 1934.
10. Perold, Untersuchungen über Weinessigbakterien, Cbl. Bakt., II, Abt., B. 24, 13, 1909.
11. Wieland H., Bertho A. Ueber den Mechanismus der Oxydationsvorgänge. XV. Das Wesen der Essigsäuregärung. Lieb. Ann. Chem., B. 467, 95, 1928.
12. Wüstenfeld, Essigfabrikation, Berlin, 1930.

THE EFFECT OF EXTERNAL CONDITIONS ON ACETIC FERMENTATION

I. L. Rabotnova

Summary

A study was carried out of the physiolcgical properties of acetic bacteria (rapid method) under the conditions of continuous fermentation on special devises. The bacteria were disseminated on shavings of beech and clippings of porcelain tubes. The following are the results obtained.

1. The intensity of aeration exerts a strong influence upon the productivity of bacteria (daily yield of acetic acid). Abrupt increase or decrease of aeration inhibit the activity of bacteria, sometimes for several days.

2. The decrease in bacterial activity is accompanied by mass washing off of bacteria from the shavings. Whereas almost no bacteria will be found in the washings in the case of active bacteria. As to porcelain, the bacteria are washed off at any conditions.

3. The study of the effect of the alcohol and acetic acid content on the productivity of bacteria showed that with the total bulk of 60—70 cm^3 a day (this corresponds to 40 liter in industry) the optimal concentration of alcohol is 5% and of the acid 6%.

4. Addition of sugar greatly increases the efficacy of the bacteria. They consume 5 to 20 mgs sugar to produce 1 g acetic acid. Their productivity amounts to 7—8 kgs (in terms of the bulk of shavings in industry).

5. Must does not offer any particular advantages as compared with glucose in the presence of ammonium salts.

6. An abrupt change in the concentration of must does not affect the productivity of bacteria.

7. There occurs a dissociation of the bacteria into S-and R-forms which differ in the aspect of the colonies. No essential differences in acid production have been found in both types of bacteria.

Institute of Microbiology of the
Academy of Sciences of the USSR
Moscow

АДАПТАЦИЯ ДРОЖЖЕЙ К ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

А. А. Имшенецкий и *Л. Г. Логинова*

Способность сравнительно быстро адаптироваться к разнообразным условиям существования составляет одну из специфических особенностей микробов. В пределах одного и того же вида могут встречаться многочисленные варианты, резко отличающиеся друг от друга. Такая пластичность микроорганизмов, неразрывно связанная с их космополитизмом, весьма характерна для этой группы живых существ. Под пластичностью следует подразумевать, конечно, не адэкватные изменения, вызываемые внешней средой, а частоту возникновения новых вариантов в популяции и исключительно быстрый отбор, который возможен только у микробов. Оба эти момента обусловлены скоростью размножения клеток, которая приводит к тому, что один и тот же вид в природе может быть представлен колоссальным количеством особей.

Исследования по изменчивости микроорганизмов уже давно установили, что под влиянием различных внешних воздействий у микробов могут внезапно возникнуть варианты (мутанты). Однако в этих экспериментах возникающие варианты помещаются в те же условия, в которых существовал исходный штамм. Если под влиянием внешнего фактора, например лучистой энергии, возникают варианты, физиология которых требует иных условий для жизни, то эти новые варианты не разовьются вообще. В этом случае условия для существования отберут только формы, не слишком отличающиеся от исходной культуры т. е. обладающие сходной физиологией.

Совершенно иную картину мы имеем в тех случаях, когда в условиях эксперимента действие определенного агента будет сочетаться с последующим отбором. Селекция осуществляется при этом нарушением обычных условий жизни и созданием обстановки, накапливающей изменения в определенном направлении.

К этим исследованиям в первую очередь необходимо отнести так называемые опыты по приучению микроорганизмов. Независимо от того, будет ли производиться адаптация к ядам, высокой или низкой температуре, повышенному осмотическому давлению или иному фактору, в этих экспериментах одно и то же внешнее воздействие одновременно вызывает образование вариантов и обусловливает отбор вновь возникающих форм. Успех этих опытов может быть объяснен значительным количеством генераций у микробов, так как это лежит в основе быстрой селекции.

Адаптация микроорганизмов к высоким температурам — частный случай такого приучения клеток к новым условиям жизни. Эти исследования приближают нас к выяснению механизма образования термофильных микробов. Воспроизводя в лабораторных условиях то приспособление к высокой температуре, которое привело к возникновению флоры горячих источников или нагревающегося органического вещества, мы даем экспериментальное обоснование формированию новых видов. Когда Далинджер [Dallinger [3]) сообщил о результатах своих классических исследований по адаптации простейших к высоким температурам, Дарвин

сообщил ему в письме, что, по его мнению, эти наблюдения объясняют присутствие водорослей в горячих источниках. Таким образом, приучение микробов, как включающее изменчивость и отбор, имеет общебиологический интерес.

Говоря об адаптации микроорганизмов к повышенной температуре, необходимо отметить еще одну существенную деталь. Среди термофильных микробов известны физиологические группы, необычайно широко распространенные в природе. Достаточно указать на термофильные бактерии, восстанавливающие нитраты или сульфаты, сбраживающие целлюлозу, и другие виды. В противоположность этому термофильные возбудители некоторых других процессов встречаются очень редко, а возможно, и совсем отсутствуют. Ранее неоднократно отмечалась высокая биохимическая активность термофильных микробов [1, 2]. В связи с этим отсутствие в природе нужных физиологических групп микробов побуждает начать исследования по выведению необходимых форм. Этот путь, несомненно, длителен и практически может представить интерес только тогда, когда аналитическая селекция, т. е. поиски желаемого вида в природе, остается безуспешной.

Замечание о редком нахождении некоторых термофилов в природе относится, между прочим, к дрожжам. Наши попытки выделить из различных источников дрожжи, сбраживающие углеводы при 60 °, не дали положительных результатов. Возможно, что следовало искать виды с более низким температурным оптимумом роста. Отметим, что Крюиф (Kruyff [7]), исследуя почву тропиков, изолировал из нее разнообразные термофильные бактерии, но дрожжей, размножающихся при высоких температурах, он не нашел.

Между тем термофильные дрожжи, несомненно, существуют, но растут при более низких температурах, чем термофильные бактерии. Такие дрожжи были выделены Джонсоном (Johnson [6]) с листьев эвкалипта. У этого вида, описанного как Saccharomyces Thermantitonum, температурный оптимум лежал между 39 и 45°, и эта особенность коррелировала с высокой терморезистентностью спор — последние выдерживали десятиминутное нагревание при 85°.

Дальнейшая судьба этого вида дрожжей подтверждает, что отношение микроорганизмов к температуре в значительной степени определяется той температурой, при которой они живут и размножаются. Культивирование этого вида в музее при относительно низких температурах привело к тому, что через 14 лет его температурный оптимум был ниже, чем непосредственно после выделения (Эйлер и Лаурин, Euler u. Laurin [5]). Еще позднее Штеллинг-Декер (Stelling-Dekker [8]) идентифицировала этот вид с Saccharomyces ellipsoideus, так как за 26 лет он полностью утратил свою термофильность.

Обладают ли термофильные дрожжи только способностью сбраживать углеводы при более высоких температурах или брожение при этом протекает скорее, чем обычно? Если исходить из аналогии с другими процессами, вызываемыми термофилами, то и в этом случае должно наблюдаться ускорение брожения. Однако в работах, посвященных спиртовому брожению при высоких температурах, этот вопрос не освещен. Дрожжи, относительно устойчивые к высоким температурам, могут иметь значение в тех случаях, когда температура сбраживаемой среды превышает оптимум роста обычно применяемых дрожжей. Конкретно это относится к бродильным производствам в тропических странах, а также сбраживанию заторов в странах с умеренным климатом в летнее время. Повышение температуры среды до 37—38° нередко создает летом серьезные затруднения для спиртовой промышленности.

Описанные ниже опыты по адаптации дрожжей к высоким температурам хотя и были прерваны, однако они должны быть опубликованы как материал, необходимый для дальнейших исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика

Исследования были проведены с шестью культурами Saccharomyces cerevisiae. Необходимо учитывать, что в смешанной популяции условия для отбора могут быть иные, чем в одноклеточной культуре. Поэтому эксперименты проводились как с культурами, выделенными из одной клетки непосредственно перед началом опыта, так и с обычными музейными штаммами. Таким образом, в нашем распоряжении были следующие культуры:

№ 1 Saccharomyces cerevisiae XII раса № 2 » » XII »	Из музея Ин-та микробиологии Академии Наук	Выделена из одной клетки
№ 3 » » XII » № 4 » » XII » № 5 » » раса R	Из музея Всес. научно-исслед. ин-та спиртовой промышленности	
№ 6 » » раса Rt		Выделена из одной клетки. Культура в музее обозначена как термофильная раса дрожжей

Вначале у всех культур была выяснена способность давать рост при температуре 35, 37 и 40 °. При этом оказалось, что при 40 ° все без исключения культуры давали очень слабый рост. Это касается и так называемой термофильной расы Rt, которая, очевидно, утратила эту особенность при сохранении ее в музее. Опыты по адаптации выяснили, что различные штаммы одной и той же расы с различной скоростью приучаются к повышенной температуре. Из четырех культур Saccharomyces cerevisiae (раса XII) культура № 4, выделенная из одной клетки, легче адаптировалась к супраоптимальным температурам, чем три другие культуры. Повидимому индивидуальная изменчивость в этом случае играет известную роль, и при дальнейших опытах целесообразно экспериментировать параллельно с несколькими культурами, выделенными из одной клетки.

Культуры дрожжей систематически пересевались на сусло-агаре и сусле в пробирках через каждые 2—4 дня. Культивирование производилось при 32, 34, 36, 37, 40 и 42 °. Вначале дрожжи выращивались при более низких температурах, а затем, после нескольких пересевов, культуры пассировались при более высоких температурах.

Исходные штаммы дрожжей культивировались при 25—30° и служили контролем в течение всего срока опытов.

При пересевах необходимо вносить достаточное количество посевного материала — большую петлю налета в опытах с плотными средами и 0,5 см³ культуры в опытах с суслом.

При проверке бродильной способности дрожжей сбраживанию подвергалось пивное сусло (12° Балг.). В этих опытах устанавливалось количество выделившейся углекислоты и образовавшегося спирта за время брожения. В некоторых опытах дополнительно выяснялось количество редуцирующих веществ, остающихся несброженными в среде. В отбродившем сусле определялись процент клеток, окрашивающихся метиленовой синькой, а также общее количество дрожжевых клеток, содержащихся в 1 см³ среды.

Временная и постоянная адаптация

Дрожжи — исключительно удобный объект для опытов по адаптации к высокой температуре. Наблюдение за характером роста дрожжей на плотных средах и микроскопия культуры дают возможность судить о том, как идет их приспособление. При супраоптимальных температурах налет

дрожжей на сусло-агаре становится более скудным и приобретает различные оттенки коричневого цвета: от светлошоколадного до темнокоричневого. Чем выше температура, тем темнее окрашен штрих. Микроскопия выясняет, что окраска культуры зависит от резких изменений морфологии и состояния дрожжей. Среди них много отмирающих плазмолизированных мелких клеток, быстро окрашивающихся метиленовой синькой. Такие буреющие культуры напоминают те летальные варианты которые возникают под влиянием различных внешних факторов: продуктов собственной жизнедеятельности дрожжей, лучистой энергии, наркотиков и ядов и т. п. Темная окраска культуры говорит о далеко зашедших патологических изменениях, вызванных супраоптимальной температурой, и такие культуры дают скудный рост при пересевах, а нередко вообще погибают. Эти бросающиеся в глаза изменения могут служить надежным критерием состояния дрожжей, и при адаптации их необходимо широко пользоваться этим признаком. Так, пассажи при более высоких температурах можно начинать только тогда, когда при более низкой (предыдущей) температуре эти культуры не приобретают темного цвета. При появлении коричневого окрашивания надо понизить температуру выращивания дрожжей.

В процессе работы неоднократно наблюдалось следующее интересное явление. В культурах дрожжей, находящихся при высоких температурах, на поверхности бурого налета вырастали мелкие, светлые, вторичные колонии. Возникло предположение, что появление белых колоний либо связано с размножением клеток, наиболее устойчивых к высокой температуре, т. е. с отбором определенных особей из популяции, либо с возникновением заново терморезистентной расы дрожжей и ее последующим размножением. Однако отсевы из этих светлых колоний, вкрапленных в бурый фон, не дали культур с более высоким температурным максимумом роста, и тем самым появление этих колоний не ускорило процесса выведения варианта, адаптированного к повышенной температуре.

Существенный вопрос о сроках, необходимых для приучения дрожжей, осложняется явлением, которое мы обозначаем как «временную адаптацию». Заключается она в том, что после сравнительно небольшого числа пассажей при возрастающей температуре можно довольно быстро получить культуру, растущую, например, при 40 или 42 °, но при дальнейших пересевах культура буреет и погибает. Повидимому, кратковременное действие высокой температуры микроорганизмы могут еще выдержать, тогда как повторное влияние этой же температуры приводит к своеобразной «тепловой дегенерации», которая заканчивается отмиранием культуры. Таким образом, даже обильный, но однократный рост при высоких температурах еще не говорит о приспособленности микроорганизмов к этим условиям. Повторные пересевы выясняют степень этой приспособленности.

В противоположность временной, стойкая адаптация дрожжей к супраоптимальным температурам достигается постепенным повышением температуры культивирования. При стойкой адаптации рост дрожжей и их бродильная функция не ослабевает при многочисленных пересевах и длительном культивировании.

Сбраживание углеводов адаптированными дрожжами

Опыты по адаптации проводились в течение 6 мес. За этот срок все шесть культур дрожжей удалось путем постепенного приучения к супраоптимальным температурам сделать относительно термоустойчивыми. Однако в наиболее короткий срок удалось адаптировать одноклеточную культуру Saccharomyces cerevisiae XII расу, обозначенную выше под № 4.

Хотя эта культура и приучалась постепенно к супраоптимальным температурам, но количество пересевов при различных температурах было сравнительно небольшим, как это видно из следующих данных:

При 32° — 2 пересева
» 34 — 3 »
» 36 — 2 »
» 40 — 27 пересевов

После 8 пассажей при 40 ° были начаты первые опыты по определению бродильной способности дрожжей. Адаптированные культуры дрожжей продолжали пересеваться и выращиваться при 40 °, и в общей сложности при этой температуре было сделано 27 пассажей. Опыты по сбраживанию сусла должны были выяснить степень приспособленности дрожжей к супраоптимальной температуре. Схема опытов была следующей. В колбы, содержащие 90 см ^{3} пивного сусла (12 ° Балг.), вносилось 10 см ^{3} культуры дрожжей. Увеличивая или уменьшая количество клеток в единице объема вносимой культуры, мы получали посевной материал, содержащий одинаковое количество дрожжей. Таким образом, независимо от температуры, при которой выращивался посевной материал, в опытные колбы вносилось одинаковое число клеток.

Сбраживание сусла в опытных колбах при 40° производилось культурой дрожжей, адаптированной к 40°. Контролями служили колбы, в которых сусло сбраживалось исходным штаммом, все время культивировавшимся при 30°. Брожение сусла, зараженного исходным штаммом, протекало при 40° (первый контроль) и параллельно при 30° (второй контроль).

Результаты первого опыта, проведенного после восьми пассажей культуры при 40°, приведены в табл. 1.

Таблица 1

Saccharomyces cerevisiae XII раса после 8 пассажей	CO_2 в г	Спирт в г	Редуцирующие вещества в г	Клетки, окрашивающиеся метиленовой синькой, в %	Количество дрожжей в 1 см^3 в млн.
С 40° на 40°	3,00	3,50	4,92	5,95	33,75
С 30° на 40°, 1-й контроль	1,90	7,59	6,49	42,7	26,12
С 30° на 30°, 2-й контроль	3,28	3,79	3,75	26,4	71,25

Мы видим, что культура дрожжей, развивающаяся при 40°, приспособилась к этой температуре. Она сбраживает сусло значительно лучше, чем культура, непосредственно перенесенная с 30° на 40°. В последнем случае количество образующегося спирта в два раза меньше.

В дальнейшем адаптированная культура систематически пересевалась и посевы выдерживались при 40°. Периодически производилась проверка ее бродильной способности. Такие опыты были поставлены после 14, 23 и 27-го пассажа культуры при 40°. Данные этих опытов сведены в табл. 2. Для наглядности результаты сбраживания сусла после 27 пассажей изображены в виде кривых на рис. 1.

Цифровой материал, приведенный в таблице, с несомненностью доказывает факт приспособления Saccharomyces cerevisiae к супраоптимальной температуре. Количество выделившейся углекислоты и образовавшегося спирта, а также и содержание редуцирующих веществ, оставшихся несброженными в среде, говорят об адаптации дрожжей к новым температурным условиям. Исходный штамм при 40° постоянно образует значительно меньше спирта. Общее количество спирта, образующегося при 40° в культуре адаптированного штамма, лишь немногим ниже, чем при сбраживании сусла исходной культурой при 30 °. Повидимому даже 27 пассажей еще недостаточно для полной адаптации дрожжей к 40°. Дрожжи,

Таблица 2

Saccharomyces cerevisiae XII раса	CO_2 в г	Спирт в г	Редуцирующие вещества в г	Клетки, окрашивающиеся метиленовой синькой, в %	Количество дрожжей в 1 см³ в млн.
После 14-го пассажа:					
С 40° на 40°	2,68	3,40		30,6	50,12
С 30° на 40°, 1-й контроль	1,39	1,99		70,3	19,37
После 23-го пассажа:					
С 40° на 40°	2,73	2,91	3,64	19,2	32,50
С 30° на 40°, 1-й контроль	1,62	1,94	4,83	84,4	36,25
С 30° на 30°, 2-й контроль	2,92	3,36	2,09	11,3	46,25
После 27-го пассажа:					
С 40° на 40°	2,17	2,51		18,4	28,62
С 30° на 40°, 1-й контроль	0,74	1,11		44,0	24,30
С 30° на 30°, 2-й контроль	2,46	2,87		7,6	77,50

приспособившиеся к повышенной температуре, хотя и размножаются довольно интенсивно, но по сравнению с дрожжами, культивируемыми при 30° дрожжевых клеток в 1 см³ среды, приблизительно в два раза меньше. Одновременно с более медленным размножением необходимо отметить, что у адаптированного штамма количество мертвых или ослабевших клеток, окрашивающихся метиленовой синькой, значительно ниже, чем в культурах исходного штамма при выращивании его при 40°. Меньшее число окрашивающихся клеток подтверждает приспособление дрожжей. В то же время следует отметить более высокий процент мертвых, воспринимающих метиленовую синьку, дрожжей у приученного штамма по сравнению с исходной культурой, развивающейся при 30°.

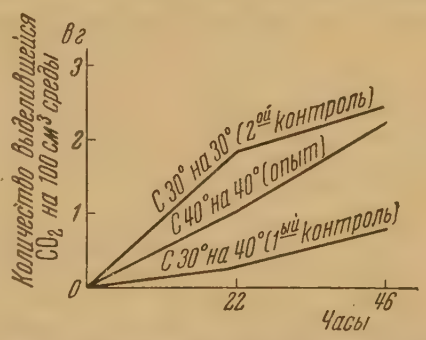

Рис. 1. Сбраживание сусла культурой Saccharomyces cerevisiae, адаптированной к повышенной температуре (после 27 пассажей).

Таким образом, за сравнительно короткий период времени можно адаптировать дрожжи к супраоптимальным температурам. Эта адаптация является стойкой, так как через 27 пассажей при 40° бродильная способность дрожжей не изменилась и тепловая дегенерация, о которой говорилось выше, не наступила.

Подобное приучение, конечно, только начальная стадия процесса приспособления к повышенным температурам. Полученные варианты дрожжей нельзя рассматривать как термофильные, и, повидимому, для значительного сдвига температурного максимума роста необходимо длительное приучение дрожжей к повышенной температуре.

Отметим, что адаптация дрожжей к некоторым ядам, антисептикам происходит несколько легче, чем к температурному фактору.

В теоретическом отношении интересно, что адаптированные дрожжи, хорошо сбраживая углеводы, размножаются значительно медленнее. Через 46 час. в культуре исходного штамма, развивающегося при 30°, и у адаптированной культуры, сбраживающей сусло при 40°, образуется

приблизительно одинаковое количество спирта, тогда как количество дрожжевых клеток в культуре адаптированного штамма в два раза меньше. Повидимому, нарушение нормальных соотношений между накапливающейся биомассой дрожжей и количеством образовавшегося спирта характерно для вариантов, приспособившихся к высоким температурам. Если мы учтем, что количество жизнеспособных клеток в культуре адаптированной расы меньше, чем в контроле, то необходимо допустить более высокую биохимическую активность каждой дрожжевой клетки.

Объяснить этот факт могут только дальнейшие исследования по приспособлению микроорганизмов к повышенным температурам, и поэтому мы ограничимся только двумя предположениями.

Повидимому почкование дрожжей нарушается высокой температурой сильнее, чем сбраживание углеводов, и в процессе адаптации активность размножения отстает от активности энзиматических процессов. Следовательно, уменьшение количества клеток в культуре говорит о неполной адаптации, и возможно, что при длительном существовании дрожжей при высоких температурах их почкование будет происходить все более и более интенсивно.

Второе предположение основано на изучении биологии различных термофильных бактерий. Их культуры, обладая высокой биохимической активностью, содержат в единице объема относительно мало клеток. В связи с этим возможно, что в процессе приучения дрожжей мы сталкиваемся не только с действием температуры как фактора, лимитирующего жизнедеятельность клеток и вызывающего изменения несомненно патологического характера, но наряду с этим происходит ускорение ферментативных реакций, которое подчинено правилу Вант-Гоффа. Можно предполагать, что при адаптации дрожжей деятельность энзиматического комплекса и все процессы, связанные с обменом, настолько интенсифицируются, что это отражается на размножении, а с другой стороны, приводит к преждевременному старению и массовому отмиранию клеток. В известной мере это подтверждается значительным числом окрашивающихся клеток, обнаруживаемых в культурах адаптированного штамма. Возможно, что высокая бродильная способность и относительно медленное почкование клеток, наблюдаемое у адаптированного штамма, соответствуют таким же отношениям, существующим у термофильных микробов, живущих в природе. В этом случае дальнейшее, даже длительное культивирование адаптированных дрожжей при высокой температуре не нарушит этого соотношения, и размножение клеток будет отставать.

Таким образом, под влиянием супраоптимальных температур в культурах дрожжей одновременно возникают и селекционируются терморезистентные формы. Это позволяет экспериментально воспроизвести процесс приспособления, который лежит в основе образования термофилов в природе.

Выводы

1. Развитие дрожжей при повышенных температурах не говорит о полной приспособленности их к этим условиям, так как нередко за этим следуют дегенерация и гибель культуры. Необходимо различать временную и стойкую адаптацию к высокой температуре.

2. В лабораторных условиях можно адаптировать дрожжи (Saccharomyces cerevisiae XII раса) к супраоптимальной температуре. Такие культуры сбраживают углеводы при высоких температурах значительно лучше, чем исходная раса, и полностью сохраняют свою активность при хранении.

3. Обладая высокой бродильной способностью, адаптированные дрожжи размножаются несколько медленнее.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
и Центральный научно-исследовательский
институт спиртовой промышленности
Москва

Получено 3. VI. 1943

ЛИТЕРАТУРА

1. Имшенецкий А. Биохимическая активность термофильных бактерий. Докл. Акад. Наук, 30, 666, 1941.
2. Имшенецкий А. О скорости процессов, вызываемых мезофильными и термофильными бактериями. Микробиология, 10, 385, 1941.
3. Dallinger W. The President's Address, J. Roy. Microsc. Soc., 185, 1887.
4. Euler H. und Laurin I. Zur Kenntnis der Hefe Saccharomyces Thermantitonum. Biochem. Z., 97, 156, 1919.
5. Euler H. und Laurin I. Zur Kenntnis der Hefe Saccharomyces Thermantitinum. Biochem. Z., 102, 258, 1920.
6. Johnson, J. Inst. Brew., 11, 1905.
7. de Kruyff E. Les Bactéries thermophiles dans les Tropiques. Ctbl. Bact. 2. Abt. 26, 65, 1910.
8. Stelling-Dekker. Die Sporogenen Hefen.1931.

ADAPTATION OF YEAST TO HIGH TEMPERATURE

A. A. Imšenecki and *L. G. Loginova*

Summary

1. The development of yeast at high temperatures does not yet testify complete adaptation to these conditions, since it is frequently followed by degeneration and death of the culture. There are to be distinguished temporary and stable adaptation to high temperature.

2. Yeast (Saccharomyces cerevisiae XII race) may be adapted under laboratory conditions, to supra-optimal temperature (40 °). Such cultures ferment carbohydrates at high temperatures much better than does the original strain and retain full activity when being stored.

3. While possessing a high fermentation capacity the adapted yeast multiply somewhat more slowly.

Institute of Microbiology
of the Academy of Sciences of the USSR
Moscow

БАКТЕРИАЛЬНАЯ МАССА РИЗОСФЕРЫ РАСТЕНИЙ

Н. А. Красильников

Значение микрофлоры как биологического фактора в почвообразовательных процессах определяется количеством и видовым составом ее. По современным данным, количество бактерий в почве насчитывается от 100 000 до 5 000 000 000 в 1 г (Риппель, Rippel [10], Фегер, Feher [5]).

По нашим наблюдениям, микронаселение почв определяется ее свойствами и растительным покровом. Чем больше перегноя в почве, тем больше микроорганизмов в ней. Распределяются бактерии очагами вокруг растительных остатков, но особенно их много вокруг корней.

Почва слоем в 1—3 мм, примыкающая непосредственно к поверхности корней, почти насыщена микробами, главным образом бактериями. Этот слой мы называем биологически деятельным слоем, так как здесь наиболее интенсивно протекают процессы превращения веществ.

Применяя метод разведения Гильтнера в видоизменении Германова, мы насчитываем в 1 г прикорневого слоя почвы от 10 млн. до 50 млрд. бактерий, и даже больше. Эти цифры колеблются в зависимости от вида растений и почвы, а именно:

Под люцерной в сероземе Вахшской долины (Таджикск. ССР)	10—50 млрд.
» хлопчатником в сероземе Вахшской долины (Таджикск. ССР) .	100—200 млн.
» люцерной в каштановой почве Заволжья	5—20 млрд.
» пшеницей » » » »	50—1000 млн.
» » в подзоле Московской области	1—10 »
» клевером » » » »	100—500 »

Из работ Дитмера (Dittmer [3, 4]), Павличенко (Pavlychenko [9]), Савинова и Панковой [2] и др. мы знаем, что в одном кубическом метре поверхностного слоя почвы (0—25 см) содержится корней вместе с волосками общим протяжением около 11 тыс. км.

Поверхность этих корней составляет около 120 м². Если произвести подсчет микробного населения прикорневой зоны, исходя из этих показателей и наших исследований, то получим следующие цифры.

На поверхности корней, равной 120 м², прикорневой почвы слоем в 1 мм (среднее) содержится 120 кг.

В сероземе под люцерной в условиях Средней Азии в 120 кг прикорневой почвы содержится (берем среднее — 20 млрд. бактерий в 1 г) 20 млрд. $\times 1000 \times 120 = 2\,400\,000$ млрд. клеток, что по весу равно 2,4 кг бактерий (1 млрд. клеток весит 1 мг).

По нашим подсчетам в 1 мг содержится 1000—1200 млн. клеток Pseudomonas fluorescens, по Mac Niel, Latzer и Rerr [8] 1400 млн. клеток B. coli; по Буткевичу [1] 1 млрд. клеток бактерий весит 0,5 мг; по Иенсену (Jensen [6]), 1 млрд. клеток азотобактера весит 5 мг.

В прикорневой почве поверхностного слоя гектара будем иметь $2{,}4 \text{ кг} \times 2500 = 6000$ кг.

Вне зоны корней в среднем образце той же почвы насчитывается около 1 млрд. клеток, или 1 мг по весу бактерий в 1 г.

В почве поверхностного слоя всего гектара (исключая ризосферной слой) содержится 2200 кг.

Следовательно, в верхнем слое до 25 см серозема, находившегося 2—3 г под люцерной в условиях Вахшской долины, содержится около

8 т живых бактерий. Из них три четверти приходится на прикорневую зону.

В почвах малоплодородных, например, в подзоле Московской области, бактериальная масса ризосферы клевера 2—3-летнего возраста составляет в среднем около 900 кг. Если к этому прибавить бактерии, обитающие вне зоны корней (50 млн. в 1 г), в среднем около 100 кг на гектар, то получим всего на гектар поверхностного слоя 1000 кг.

В той же почве под пшеницей бактериальная масса ризосферы составляет всего 6 кг, а средняя величина со всего гектара верхнего слоя почвы равна 8 кг бактерий.

В своих подсчетах мы учитывали только бактерии. В почве же кроме них находятся другие представители микробов — грибы, актиномицеты, водоросли и простейшие, общее количество которых достигает 1—20 млн. в 1 г, а по весу составляет примерно 5—10% общей бактериальной массы.

В наш подсчет не вошли также мертвые клетки микроорганизмов, а равно все те микробы, которые не высеваются на питательные среды и не учитываются вообще современными методами анализов.

Следовательно, приведенные нами цифры микробного населения почвы преуменьшены. Надо считать, что в действительности общее количество микробной массы больше.

Чтобы полнее представить роль микроорганизмов как накопителей органического вещества в почве, следует указать еще на следующее обстоятельство. Микроорганизмы в почве находятся в состоянии непрерывного отмирания и нарождения особей. Средний возраст бактериальной клетки в почве в течение вегетационного периода равен примерно 15—20 суткам. Через эти сроки происходит смена поколений: старые клетки отмирают, новые нарождаются. Народившиеся особи питаются, ассимилируют извне питательные элементы и создают новые запасы органического вещества. За вегетационный период число генераций может быть 8—10 для средней полосы и 18—20 для юга. Это значит, что вся живая масса бактерий в почве Вахшской долины отмирает и нарождается 18—20 раз, а в подзоле Московской области 8—10 раз. Иными словами, в первом случае за вегетационный период нарождается общей массы бактерий около 150 т, во втором случае под клевером около 9 т, а под пшеницей только 70—80 кг.

Если бы микробы не разлагались и не подвергались минерализации, то в указанных почвах отлагались бы большие запасы органического вещества, чего в действительности не наблюдается или наблюдается только частичное накопление при определенных условиях. В почвах происходит быстрый распад бактерий. Клубеньковые бактерии, по нашим наблюдениям, полностью разлагаются через 3—5 суток в подзолистой, клеверо-утомленной почве, а в черноземе распадаются примерно 70—80% внесенных клеток. Азотобактер в подзоле разлагается нацело уже через 1—2 суток; а в каштановых почвах — около 50% внесенных клеток (наблюдения велись на предметных стеклах, зарытых в почву). Скорость разложения бактериальных тел зависит от состава почвы, температуры, влажности и самого микробного населения. Скорость размножения клеток и скорость их распада и минерализации в разных почвенных условиях различны.

Приведем некоторые данные, полученные нами при подсчете азота, потребляемого бактериями. По определению Николе и Эллиларе (Nicole a. Allilaire [7]), бактерии содержат азота около 10% от сухого веса. В свежей бактериальной массе 80% воды. В соответствии с этими данными бактериальная масса ризосферы люцерны Вахшской долины содержит около 120 кг азота.

Бактерии ризосферы в некоторых почвах являются мощным аккумулятором азота. Последний находится в непрерывном превращении. При последовательных сменах генераций и разложения клеток бактерий не-

которая часть азота освобождается, минерализуется и становится достоянием растения.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 28. II. 1944.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буткевич В. С. О бактериальном населении Каспийского и Азовского морей. Микробиология, т. VII, вып. 9—10, стр. 1005, 1938.
2. Савинов Н. и Панкова Н. Корневая система растительности целинных участков степей Заволжья и новый метод ее изучения. Сб. акад. Вильямса, стр. 177, 1942.
3. Dittmer H. A quantitative study of the roots and root hairs of a winter rye plant (Secale cereale). Amer. J. Bot., v. 24, 7, 1937.
4. Dittmer H. A quantitative study of the subterrenean members of three field grasses. Amer. J. Bot., v. 25, 9, 1938.
5. Feher. D. Untersuchungen über die Mikrobiologie des Waldbodens. Berlin, 1933.
6. Jensen H. Contribution to the nitrogen economy of australia wheet soils with particular reference to New South Wales, Proc. Lin. Soc., NSW 65, No 1—2, 1940.
7. Nicole u. Allilaire (1909). Цит. по Tanner'y, Bacteriology New York, 1928.
8. Mac Niel, Latzer and Rerr. Цит. по Tanner'y.
9. Pavlychenko T. Quantitative studies of the entire root systems of weed and crop plans under field conditions. Ecology, v. 18, 62, 1937.
10. Rippel A. Mikrobiologie des Bodens, Handb. der Bodenkunde, Berlin, 1939.

THE BACTERIAL MASS OF THE RHIZOSPHERE OF PLANTS

N. A. Krassilnikov

Summary

The number of microorganisms within the rhizosphere of the plants is greater than beyond the zone of the roots. The number of bacteria in the rhizosphere varies from 10 million to 50 milliard per 1 g according to the composition of the soil.

The total bacterial mass in the superficial layer of the soil (0—25 cm) adjoining the roots soils of middle Asia with a 3 year lucerne culture amounts to 6000 kg per 1 hectare and beyond the root zone to 2000 kg per 1 hectare. In soils of low fertility, such as podsol (Moscow) this figure amounts to 9000 kg (3 years old clover), and beyond the root zone — to 100 kg.

In the same soil under wheat culture the total mass of bacteria within the root zone is 6 kg.

In some soils bacteria may accumulate great amounts of organic matter along with nitrogen.

Institute of Microbiology
of the Academy of Sciences of the USSR
Moscow

УСТАНОВЛЕНИЕ ЗАСОЛЕННОСТИ ПОЧВ ПРИ ПОМОЩИ АЗОТОБАКТЕРНОЙ ПРОБЫ

С. А. Эфендиева

Засоленные пятна на культурных полях в Средней Азии обычно обнаруживаются по состоянию посева того или иного растения. Для предпосевной диагностики возможно применение химических методов анализа, но это на практике встречает затруднение из-за отсутствия на местах соответствующих лабораторий и кропотливости самого приема исследования. В силу отмеченных причин весьма желательна разработка простого приема, позволяющего устанавливать хотя бы ориентировочно факт и степень засоленности почв. Это позволило бы легко устанавливать территорию, нуждающуюся в соответствующих агротехнических и мелиоративных воздействиях.

При исследовании различных сероземных почв предложенным мной способом на нахождение в них азотобактера было отмечено, что даже умеренное засоление значительно тормозит развитие азотобактера на почвенных пластинах. На сильно засоленных почвах азотобактер отсутствовал. Исследователи, работавшие раньше с засоленными почвами, также отмечали отрицательное влияние засоления на азотобактер (Самсонов).

Азотобактерная проба весьма несложна, и простота приготовления почвенных пластин делает возможным ее использование на местах при наличии самого несложного оборудования. Поэтому мне казалось целесообразным уточнить отношение азотобактера к солям.

Для работы были использованы почвенные образцы с разной степенью засоления, взятые с голодностепной опытной станции (Пахта-Арал). Характеристика засоленности части этих почв, проанализированных химически, дается в табл. 1, где указывается также состояние развивавшегося на них хлопчатника и других культур.

Таблица 1

Содержание солей в почве, занятой посевами различных культур

№ по пор.	Наименование культур и состояние посева	Место взятия проб	Сухой остаток водной вытяжки в %	SO % милли-экв.	Cl % милли-экв.
1	Хлопчатник, развитие посева нормальное	Борозда	0,074	0,008/0,17	0,005/0,10
		»	0,126	0,046/0,96	0,019/0,39
		»	0,076	0,013/0,27	0,04 /0,08
		»	0,092	0,008/0,17	0,005/0,10
		Гребень	0,16	0,097/2,02	0,011/0,31
	Люцерна, развитие посева нормальное		0,092	0,016/0,33	0,07 /0,14
2	Хлопчатник, развитие несколько угнетенное	Борозда	0,338	0,085/1,77	0,070/1,64
		Гребень	0,394	0,097/2,22	0,084/1,75
		»	0,372	0,132/2,75	0,017/0,48
3	Хлопчатник, сильно угнетенный посев	Борозда	0,424	0,125/2,60	0,029/2,06
		»	0,084	0,023/0,48	0,005/0,14
		Гребень	3,402	0,873/18,16	0,569/16,04
		»	1,656	0,513/10,67	0,542/15,28

Продолжение

№ по пор.	Наименование культур и состояние посева	Место взятия проб	Сухой остаток водной вытяжки в %	SO% милли-экв.	Cl% милли-экв.
4	Хлопчатник, развития посева нет	Борозда	1,532	0,424/8,88	0,470/9,78
		»	1,350	0,571/11,88	0,470/9,78
		Гребень (выцвет полей)	3,096	1,570/32,68	0,416/11,73
	Бахча, выцвет солей . . .		4,210	2,482/51,51	0,376/10,60

Как видно из приведенных цифр, на засоленных почвах развитие хлопчатника начинает угнетаться при повышении концентрации солей до 0,3—0,4%.

Полная приостановка роста хлопчатника имеет место в случае достижения процента соли до 1,3—1,5 в почве борозды. По вполне понятным причинам в почве гребня имеется, как правило, повышенное содержание солей.

В почвах Пахта-Арала, как это видно из табл. 2, преобладает сульфидно-хлоридное засоление.

Таблица 2

№ по пор.	Характер почвенной пробы	Сухой остаток в водной вытяжке в %	% солей/милли-экв.						
			SO_4	Cl'	CO_3	HCO'_3	Ca	Mg	Na+K
1	Хлопчатник, сильно засоленная почва	1,656	0,513	0.542	0,0	0,025	0,179	0,008	38,6
			10,67	15,28		0,41	8,93	0,66	16,7
2	То же	3,402	0,873	0,569		0,027	0,277	0,11	0,26
			18,16	16,04	0,0	0,44	13,82	9,10	11,72

Из проанализированных почв были приготовлены почвенные пластины, причем как энергетический материал был использован этиловый спирт. В первом опыте в приготовляемых почвенных пластинах вносилась чистая культура азотобактера. В дальнейшей работе, исходя из того, что окультуренные сероземы достаточно богаты этим микроорганизмом, почвенные пластины готовились только с прибавлением спирта и воды.

Результат опыта приводится в табл. 3. Как видно, на незасоленной почве азотобактер дал сплошной рост, причем бактериальная масса довольно быстро приобрела бурый пигмент.

На пластинах из почвы, взятой с поля со слабо угнетенным хлопчатником, выросли мелкие, но довольно многочисленные колонии азотобактера. Пигментация этих колоний была явно задержана. На более сильно засоленной почве появилось еще меньше колоний азотобактера, развитие которых было сильно угнетено. Наконец, засоление, вызвавшее гибель посева хлопчатника, подавило полностью и рост азотобактера.

Таким образом, уже первый опыт показал, что азотобактер реагирует на повышение концентрации солей в почве примерно так же, как и посев хлопчатника.

Таблица 3

Развитие азотобактера на почвах разных степеней засоления при их искусственном заражении культурой азотобактера (карта 3)

№ по пор.	Характер опытной почвы	Метод взятия проб	Количество колоний азотобактера, выросших на почвенной пластине	Примечание
1	Хлопчатник, нормально развивающийся	Борозда	Сплошной рост	Масса азотобактера быстро приобрела бурый пигмент
		Гребень	»	
	Люцерна, нормально развивающийся			
2	Хлопчатник, развитие слабо угнетенное .	Борозда	Около 250	Колонии мелкие, замедленно пигментирующиеся
		Гребень	» 200	
3	Хлопчатник, развитие значительно угнетенное	Борозда	Около 100	То же
		Гребень	Роста нет	
4	Хлопчатник, растение погибло	Борозда	» »	
		Гребень		

При дальнейшей работе, как уже отмечалось, почвенные пластины готовились без добавки культуры азотобактера. Это давало возможность выявить состояние азотобактера в самой почве. Химического анализа почв также не производилось, и о степени засоления суждение составлялось лишь по состоянию посева хлопчатника. Для получения более убедительных результатов однотипичные пробы были взяты с ряда полей. В табл. 4 приводятся результаты исследования, произведенного с почвенными образцами карты № 5.

Как видно, на почвенных пластинах из незасоленной почвы отмечалось массовое развитие диффузных колоний азотобактера. Почвы, на которых отмечалось слабое угнетение хлопчатника, были довольно богаты азотобактером, но на пластинах вырастали лишь очень мелкие колонии этого микроорганизма, и их пигментация задерживалась. Значительно засоленная, судя по развитию хлопчатника, почва не содержала азотобактера. Таким образом, и в данном опыте отмечалось вполне тождественное отношение к солям у хлопчатника и азотобактера.

Интересно отметить, что на пластинах из засоленной почвы наблюдается появление сухих беловатых колоний, резко отличающихся по своему внешнему виду от азотобактера. Микроскопирование этих колоний показывает, что они состоят из крупных гранулированных палочек типа Bac. mesentericus. Эти колонии сопровождаются обычно ростом грибков, чего не обнаруживается на нормальной почве.

Если степень засоления увеличивается до пределов, вызывающих приостановку развития хлопчатника, то споровые палочки и плесневые грибки на пластинах в данном случае не развиваются. Появление споровых палочек и плесеней отмечалось не при всех анализах засоленных почв.

В нижеследующих табл. 5 и 6 даются материалы по анализу тождественных предыдущим почвам проб, но взятых с других полей.

Отдельные почвы в данном случае также отличались различной степенью засоления, которая ориентировочно нами устанавливалась по состоянию посева хлопчатника.

Таблица 4

Спонтанное развитие азотобактера на почвенных пластинах при различных степенях засоления почв

№ по пор.	Из-под какой культуры взята почва	Место взятия пробы	Количество колоний азотобактера на почвенной пластинке	Развитие других микроорганизмов	
				споровые палочки	плесень
1	Хлопчатник, нормально развивающийся	Борозда	Сплошной рост	Нет	Нет
		Гребень	» »	»	»
	Люцерна, нормально развивающаяся		» »	»	»
2	Хлопчатник, слабо угнетенный	Борозда	Многочисленные мелкие, видимые лишь под лупой колонии	Много беловатых колоний, споровых палочек	Редкий мицелий
	То же	Гребень	Изреженный рост мелких колоний	То же	То же
3	Хлопчатник, сильно угнетенный . . .	Борозда	Роста нет	Много колоний споровых палочек	Очень много мицелия
	То же	Гребень	» »	То же	То же
4	Хлопчатник, растения не развиваются	Борозда	» »	Изреженный рост споровых палочек	Роста нет
		Гребень	» »	То же	То же
	Бахча, засоленные пятна		» »	»	»

Таблица 5

Спонтанное развитие азотобактера на почвенных пластинах при различных степенях засоления почвы (карта 12)

№ по пор.	Состояние хлопчатника	Размер колоний азотобактера	Рост азотобактера на почвенных пластинах		Развитие на пластинках других микроорганизмов	
			количество колоний в поле зрения	пигментация колоний	плесеней	споровых палочек
1	Хлопчатник, нормально развивающийся . . .	Крупные	Сплошное обрастание	Есть пигментация	Нет	Нет
2	То же	»	»	»	»	»
3	» »	»	»	»	»	»
4	Хлопчатник, несколько угнетен:					
	борозда	Мелкие	5	»	Порядочно плесеней	Мало колоний
	гребень	»	2	Пигмента нет	То же	Много колоний

Продолжение

№ по пор.	Состояние хлопчатника	Размер колоний азотобактера	Рост азотобактера на почвенных пластинах		Развитие на пластинках других микроорганизмов	
			количество колоний в поле зрения	пигментация колоний	плесеней	споровых палочек
5	Хлопчатник, сильно угнетен:		Единичные колонии на чашке			Единичные колонии
	борозда	»		Пигмента нет	Порядочно плесеней	
	гребень	Роста нет				
6	То же,				То же	То же
	борозда	Мелкие	Единичные колонии	То же	»	Порядочно колоний
	гребень	»	»	»	»	То же

Как следует из данных табл. 5, уже слабая степень засоления почвы, несколько угнетающая развитие хлопчатника на почве карты № 12, вызывает сильное уменьшение числа зародышей азотобактера в почве. Как и в предыдущем случае, на засоленной почве задерживается пигментация колоний азотобактера, начинают развиваться колонии спороносных палочек и плесеней.

Предыдущие данные подтверждаются также табл. 6, в которой приводятся результаты исследования почвы, взятой с карты 1. В данном случае несколько более обильное развитие азотобактера, по сравнению с предыдущим случаем, отмечается на почве, взятой из-под слабо угнетенного хлопчатника.

Анализированные почвы химически не исследовались, но полученный результат, вероятно, объясняется более слабой степенью их засоления. На сильно засоленной почве, где хлопчатник погибал, азотобактер, споровые бактерии и плесени не развивались.

Таблица 6

Спонтанное развитие азотобактера на почвенных пластинах при различных степенях засоления почвы (карта 1)

№ по пор.	Состояние посева	Рост азотобактера на почвенных пластинах		Развитие на пластинке других микроорганизмов	
		размер колоний	количество колоний	споровых палочек	плесеней
1	Хлопчатник, нормально развивающийся:				
	борозда	Крупные	Сплошное обрастание	Нет	Нет
	гребень	»	»	»	»
2	Хлопчатник, слабо угнетен:	Мелкие, слабо пигментир.		Порядочно колоний	Имеются ростки плесени
	борозда	То же	Около 1500	То же	То же
	гребень		» 480		
3	Хлопчатник, сильно угнетен:				
	борозда	»	» 130	»	»
	гребень	»	» 85	»	»
	Хлопчатник погибает:				
	борозда	»	Нет	Нет	Нет
	гребень	Роста нет			

Таким образом, приведенный материал ясно показывает, что азотобактер относится к повышению концентрации солей примерно так же, как и хлопчатник. Это дает основание предложить пользоваться азотобактерной пробой для ориентировочной диагностики засоления орошаемых земель. Конечно, можно отметить, что отдельные сельскохозяйственые культуры несколько различно относятся к засоляющим почву солям, но это при ориентировочных исследованиях может быть игнорировано, так как чрезмерно отличных градаций в этом отношении у сельскохозяйственных растений все же не наблюдается.

Интересно отметить, что при посеве на МПА различно засоленных почв не было найдено существенного изменения в общем количестве сапрофитных микроорганизмов по мере увеличения процента соли в почве. Отсюда можно было сделать заключение, что большинство метатрофных бактерий почвы значительно менее чувствительно относятся к явлению засоленности, чем азотобактер. С целью проверки данного допущения из сероземной почвы были выделены различные микроорганизмы и затем было испытано их развитие на МПА, содержащем разный процент поваренной соли. Результат описываемого опыта приводится в табл. 7.

Таблица 7

Отношение различных микроорганизмов к повышенным концентрациям поваренной соли

№ по пор.	Название микроорганизма	% NaCl в МПА										
		Контроль	0,5	1	1,25	1,5	1,75	2,0	2,5	3,0	3,5	4
1	Azotobacter сероземный, штамм № 1	+++	+++	+++	+++	+++	++	±				
2	Azotobacter сероземный, штамм № 2	+++	+++	++	+++	+++	+++	±	—	—	—	—
3	Azotobacter сероземный, штамм № 3	+++	+++	+++	+++	+++	++	±	+	—	—	—
4	Azotobacter сероземный, штамм № 4	+++	+++	++	++	++	++	±	—	—	—	—
5	Azotobacter сероземный, штамм № 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
1	Споровая палочка, штамм № 1	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
2	Споровая палочка, штамм № 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		++	++
3	Споровая палочка, штамм № 3	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	++
4	Споровая палочка, штамм № 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
5	Споровая палочка, штамм № 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1	Клубеньковая бактерия, штамм № 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		++	+	—
2	Клубеньковая бактерия, штамм № 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		++	+	—
1	Неспоровая палочка из рода Pseudomonas, штамм № 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—
2	Неспоровая палочка из рода Pseudomonas, штамм № 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3	Неспоровая палочка из рода Pseudomonas, штамм № 3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4	Неспоровая палочка из рода Pseudomonas, штамм № 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5	Неспоровая палочка из рода Pseudomonas, штамм № 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1	Aspergillus flavus, штамм № 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
2	Fusarium	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3	Aspergillus niger	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4	Aspergillus flavus, штамм № 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
5	Penicillium glaucum	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+
6	Monilia	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1	Actinomyces, штамм № 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
2	Actinomyces, штамм № 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

Условные обозначения: +++ хорошее развитие, ++ удовлетворительное развитие, + слабый рост, ± очень слабый рост, — отсутствие роста.

Как видно из таблицы, азотобактер кончает развиваться при содержании NaCl в среде около 2%. Клубеньковые бактерии люцерны переносят до 3,5%, а большинство иных сапрофитных микробов не кончает развития даже на средах, имеющих 4% NaCl. Таким образом, можно сделать заключение о значительно большей чувствительности азотобактера к солям по сравнению с другими микроорганизмами.

При сопоставлении влияния различных солей на развитие азотобактера было найдено, что сульфаты менее вредны по сравнению с хлоридами, а магниевые соли также слабее тормозят рост азотобактера, чем натриевые.

Так, для разных солей могут быть указаны нижеследующие концентрации, тормозящие развитие азотобактера:

$NaCl$ 2—2,5%
Na_2SO_4 выше 2,5%
$MgCl_2$ около 3,2%
$MgSO_4$ около 5,0%

В литературе можно встретить указание на наличие в природе солетолерантных рас азотобактера (Сушкина). Отсутствие значительной обсемененности засоленных почв Голодной степи подобными формами азотобактера, по моему мнению, объясняется динамическим состоянием концентрации солей в окультуренных почвах, затрудняющим отбор осмофильных форм этого микроба на определенной территории пашни.

Работа проведена под руководством проф. Е. Н. Мишустина, которому приношу мою искреннюю благодарность.

Выводы

1. При анализе орошаемых различно засоленных сероземов на состояние в них азотобактера было обнаружено, что данный микроорганизм реагирует весьма чутко на явление засоления. Чувствительность азотобактера к солям приближается к реакции хлопчатника. При концентрации солей в почве от 0,3 до 0,4% отмечается угнетенное развитие как хлопчатника, так и азотобактера.

Это сказывается в ограничении размера колоний и задержке их пигментации. Дальнейшее повышение концентрации солей вызывает уменьшение числа колоний азотобактера, дающих нерасплывающиеся и трудно пигментирующиеся колонии. Концентрации солей в почве около 1,5% и более высокие практически прекращают развитие хлопчатника и азотобактера.

2. Отмеченные факты позволяют использовать азотобактерную пробу для ориентировочных определений степени засоления почвы. Для этого наиболее удобно пользоваться методом почвенных пластин.

3. Большинство сапрофитных микроорганизмов менее чувствительно к повышенным концентрациям соли по сравнению с азотобактером.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 6, III. 1944.

THE DETERMINATION OF THE SALT CONTENT OF SOILS BY MEANS OF THE AZOTOBACTER TEST

S. A. Efendieva

Summary

1. An analysis was made of irrigated soils varying in salt content for the condition of Azotobacter in their microorganism was found to be very sensitive to the salt content of the soils.

In this respect Azotobacter approaches the cotton-plant At 0.3—0,4% salt concentration in the soil the development of both Azotobacter and cotton-plant is inhibited.

This results in the limitation of the size of the colonies and in inhibition of pigmentation. Further increase in the salt concentration calls forth a diminution in the number of the colonies of Azotobacter that produces non-deliquescent and difficultly pigmentated colonies. About 1,5% or more salt concentration of the soil practically inhibit the development of the cotton plant and of the Azotobacter.

2. The Azotobacter test may therefore be used for an approximate estimate of the salt content of the soil.

For this purpose the method of soil plates is the most convenient one.

3. Most of saprophytic microorganisms are less than Azotobacter sensitive to increase salt concentrations.

Institute of Mibrobiology
of the Academy of Sciences of the USSR
Moscow

О МИКРОФЛОРЕ СПЕЦИЙ

Ф. М. Билянский

Одним из факторов, обусловливающих нестерильность консервов, является высокая бактериальная загрязненность сырья. Особенно велико количество микроорганизмов в специях. Между тем загрязненности специй на наших заводах уделяется мало внимания. В нашей литературе вопрос этот мало освещен.

За границей давно уже обратили внимание на бактериальную загрязненность специй и на роль последних в порче пищевых продуктов. В связи с этим проведен ряд работ по изучению микрофлоры специй и по обработке их антисептиками с целью уменьшения количества микроорганизмов.

Так, Камерон (Cameron [1]), нашел, что черный перец содержит большое количество микроорганизмов. Джемс (James [4]) указывает на присутствие в специях термофильных бактерий, споры которых, а также вегетативные клетки необычайно противостоят воздействию тепла. Галл (Hall [3]) получил стерильные специи при обработке их окисью этилена, но при этом требовалась соответствующая координация концентрации окиси этилена, температуры, вакуума и продолжительности воздействия. Фабиан, Крель и Литль (Fabian, Krehl, Little [2]) нашли, что порча консервированных пикулей может быть вызвана бактериальным загрязнением специй.

Недостаточная изученность вопроса по микрофлоре специй и отсутствие данных в отечественной литературе побудили нас поставить ряд исследований по изучению количественного и группового состава микрофлоры специй, применяемых на наших заводах, а также изыскать способы к уменьшению в них количества микроорганизмов.

Объектами исследования послужили следующие специи: черный перец, душистый перец, лавровый лист, мускатный орех, гвоздика, корица.

Специи были получены в разное время — в расфасованном виде и без расфасовки. Общее количество микроорганизмов определяли методом посевов в чашках Петри с применением мясопептонного и сусло-агара. Количественный групповой учет производился по методу предельного разведения. Количественный и групповой состав микрофлоры специй приведен в табл. 1.

Табл. 1 показывает, что максимальное количество микроорганизмов содержит душистый и черный перец, а также лавровый лист, причем наибольший процент микроорганизмов относится к гнилостной группе. Заслуживает внимания обнаружение факультативных анаэробов и термофилов.

Дальнейшие исследования показали, что молотый перец содержит всегда больше микроорганизмов, чем перец в целом виде. Фабиан, Крель и Литль объясняют это явление засорением перца в процессе его размалывания. В наших исследованиях мы в молотом перце всегда получали больше микроорганизмов даже в том случае, если одни и те же пробы испытывались до и после раздробления, причем последнее производилось в условиях, препятствующих попаданию микроорганизмов извне. Увеличение, очевидно, происходит за счет микроорганизмов, глубоко проникших в зерна при нарушении целостности их оболочек.

Количество микроорганизмов, обнаруживаемых в специях, значительно возрастает при применении питательной среды (МПА) с прибавлением к ней водной настойки специй.

Таблица 1

Количество микроорганизмов в 1 г специй

Микроорганизм	Черный перец	Душистый перец	Лавровый лист	Мускатный орех	Гвоздика	Корица
Общее число	109×10^4—$72{,}10^5$	5×10^4—276×10^5	7×10^4—2×10^6	0^3—23×10^4	5×10^2—105×10^3	3×10^2—$6{,}7 \times 10^3$
Плесени	4×10^3	2×10^3	15×10^4	$2 \times 13 \times 10^3$	2×10^3	1×10^3
Гнилостные (аммонифицирующие)	10^5—10^6	10^4—10^6	10^4—10^5	0^3—10^4	10^2—10^3	10^2—10^3
Разлагающие глюкозу с газообразованием	10^2—10^5	10^2—10^4	10^2—10^3	1 —	—	—
Анаэробные (факультативные)	10^3—10^5	10^3—10^5	10^1—10^2	—	10^1—10^2	10^1—10^2
Термофильные (факультативные)	10^3—10^4	10^3—10^4	10^2—10^3	—	0—10^2	0—10^2

С целью уменьшения количества микроорганизмов мы вначале подвергли специи пастеризации в сухом виде. Не получив при этом положительных результатов, мы изменили методику. Так, каждый вид специи (1 г) опускали в колбочку со стерильной водой, взбалтывали 2—3 мин. и после разбавления делали посев в чашках Петри. Затем содержимое колбочки подвергли пастеризации (подъем 15 мин., нагревание при 80° 30 мин., охлаждение 5 мин.) и производили посев при таком же разведении, как до пастеризации.

Результаты получились совершенно неожиданные; количество микроорганизмов в черном и душистом перце не только не уменьшалось после пастеризации, но всегда возрастало. Данные этих исследований приведены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние пастеризации на изменение количества микроорганизмов в специях. Количество микроорганизмов в 1 г (в тысячах)

Наименование специй	Количество исследованных проб	До пастеризации	%	После пастеризации	%
Черный перец . .	10	4,650	100	8,865	190,6
Душистый перец	5	1,630	100	1,750	107,4
Лавровый лист .	3	545	100	110	20,2
Мускатный орех .	2	21	100	1,5	7,1
Гвоздика	2	1,4	100	0,2	14,3
Корица	2	1,7	100	0,9	52,9

Предполагая, что возрастание количества микроорганизмов в перце после пастеризации происходит вследствие распада бактериальных цепочек, мы проделали такой опыт. Перец взбалтывали в стерильной воде, а затем перелили промывную воду в другую стерильную колбочку и пастеризовали ее (без перца). При такой постановке опытов мы в некоторых случаях получали небольшое увеличение количества микроорганизмов. Здесь, очевидно, имеет место не только распад бактериальных цепочек, но и другие причины (десорбция бактерий и др.). Черный и душистый перец подвергли воздействию озона в течение трех дней по 1,5 часа ежедневно при концентрации 10 мг/м³. Однако при испытанном нами режиме озонирования уменьшения содержания микрооорганизмов не наблюдалось. В дальнейшем мы подвергли черный и душистый перец, а также лавровый лист душевой мойке в проточной воде

Данные табл. 3 показывают, что после мойки содержание микроорганизмов значительно уменьшается.

Таблица 3

Влияние обмывания на изменение количества микроорганизмов в специях. Количество микроорганизмов в 1 г (в тысячах)

Наименование специй	До обмывания	%	После обмывания	%
Черный перец . .	3,500	100	1,650	47,1
Душистый перец	2,800	100	930	33,2
Лавровый лист .	640	100	125	23,1

В экспериментальной работе принимала участие лаборантка Е. Н. Позюнкевич.

Выводы

1. Черный и душистый перец, а также лавровый лист содержат значительное количество микроорганизмов. Число микроорганизмов в перце возрастает при применении его в молотом виде, а также при прибавлении к питательной среде (МПА) водной настойки специй.

2. Помимо гнилостной и сахаролитической групп бактерий обнаружены также в специях факультативные анаэробы и термофилы.

3. При тепловой обработке (пастеризации) черного и душистого перца количество микроорганизмов значительно возрастает (вследствие распада бактериальных цепочек, десорбции бактерии и др.).

4. При душевой мойке черного и душистого перца, а также лаврового листа количество микроорганизмов значительно уменьшается.

Кафедра технологии и контроля производства Технологического ин-та консервной промышленности
Одесса

Получено 9. VII. 1941

ЛИТЕРАТУРА

1. Cameron E. J. Report on meat canning problems, The Canner Convention number, p. 95, 1937.
2. Fabian F. W., Krehl C. F. and Little, The role of spices in pickled food spoilage. Food Research., v. 4, No. 3, p. 269, 1939.
3. Hall L. Sterilized spices. Food Ind., p. 424, 1938.
4. James L. H. Reducing the microbial content of spices. Food industries, p. 428, 1938.

THE MICROORGANISMS OF SPICES

F. M. Bilyansky

Summary

1. The black and aromatic pepper as well as the laurel leaf contain a considerable number of microorganisms. The number of organisms in pepper increases when used in the powdered state and also when it is being added to nutrient media (agar) of an extract of spices.

2. Besides putrefactive and saccharolytic groups of organisms there have also been found facultative anaerobes and thermophiles.

3. Thermal treatment (pasteurization) of black and aromatic pepper increases the number of microorganisms considerably. This fact appears to be due to a number of causes, *i. e.* decomposition of bacteria, chains, desorption of bacteria, and so on.

4. Spray washing reduces the number of microorganisms in the above named spices.

5. Canning factories should wash the spices in running water prior to use.

Canning Technology and Control Department of the Canning Institute, Odessa

ЭКОЛОГИЯ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

В. Т. Панасенко.

К плесневым грибам относят представителей разных систематических групп (фикомицетов, сумчатых и несовершенных грибов). Общим признаком всех этих грибов является способность их давать при определенных условиях температуры и влажности «плесневые» налеты в виде разнообразно окрашенного мицелия. Таким образом, это группа грибов не систематического, а скорее экологического порядка.

Основными факторами, регулирующими жизнедеятельность плесневых грибов, являются температура и влажность.

Температура

Температурные границы развития плесневых грибов колеблются в среднем от 3—5 до 35—40°, но нередко можно встретить виды, могущие развиваться при температурах, более низких или более высоких.

Разное отношение к температуре явилось основанием к тому, что разделяют плесневые грибы на психрофильные, мезофильные и термофильные. Взамен этой не совсем удачной группировки мы предлагаем такую, как нам кажется, более соответствующую существующим в природе взаимоотношениям.

1. Психротолерантная группа. Эта группа включает виды, способные развиваться при отрицательных температурах (например, в холодильниках): многие виды Penicillium, некоторые виды Fusarium, Mucor, Thamnidium, Cladosporium и др.

2. Мезотолерантная группа. К этой группе относятся виды, способные развиваться при температурах от +5 до +30°, с оптимумом 20—25°. К этой группе относится подавляющее большинство видов плесневых грибов.

3. Термотолерантная группа. Включает виды плесневых грибов, способных развиваться при 40—50 °. Эта группа без достаточных оснований называется иногда термофильной. К ней относятся некоторые виды родов Aspergillus, Mucor и др., играющие большую роль при процессах самонагревания зерна, муки, сена и других продуктов.

По утверждению Ячевского [7], стойкость грибных организмов по отношению к высоким температурам обратно пропорциональна количеству содержащейся в них воды.

Постепенно изменяя температуру, можно вызвать приспособление грибных организмов к низким или высоким температурам, но только в пределах определенных границ. Резкие колебания температуры губительно действуют на грибные клетки. Такие плесневые грибы, как Aspergillus niger, Penicillium glaucum (?), Botrytis cinerea, способны в чистых культурах выдерживать охлаждение до —26°, а на средах с высоким осмотическим давлением они выдерживают еще более низкую температуру.

Мицелий некоторых видов Mucor и дрожжевые клетки могут выдерживать охлаждение до —110°. Еще более стойки по отношению к низким температурам конидии грибов, например Aspergillus и Penicillium, выдерживающие охлаждение до —210°. Некоторые плесневые грибы могут,

хотя и очень медленно, развиваться при температурах ниже 0°. Например, Botrytis cinerea, Cladosporium herbarum, Chaetostylum Fresenii, виды Penicillium и др., которые могут развиваться при —5 и —10° [8].

Таким образом, минимальная температура для некоторых плесневых грибов находится гораздо ниже 0°. Максимальная температура колеблется в пределах от 30 до 35° и лишь для некоторых грибов достигает 50—60°.

Оптимальная температура колеблется от 20 до 25°, а у некоторых доходит до 35—37°.

Таблица 1

Кардинальные температурные точки развития плесневых грибов

Название грибов	Температура		
	минимум	оптимум	максимум
Aspergillus amylovorus Panass.	3	20—25	35
A. candidus Link.	3—4	20—24	42
A. clavatus Desmaz.	5—6	20—25	40
A. flavus Link.	6—8	37	44—46
A. fumigatus Fres.	10—12	37	57—58
A. glaucus (разные виды)	4—5	27—30	40
A. nidulans (Eidam) Winter	6—8	35—37	46—48
A. niger v. Tiegh.	6—8	35—37	45—47
A. oryzae (Ahl.) Cohn	7—9	35—37	45—47
A. repens (Corda) Sacc.	4—5	26—30	38—40
A. versicolor (Vuill.) Tirab.	4—5	25—30	38—40
Alternaria tenuis Nees.	0	20—25	—
Botrytis cinerea Pers.	— 2	22—25	30—33
Beauveria Bassiana (Bals.) Vuill.	3—5	25—27	36—38
Cladosporium herbarum Link.	— 5, — 7	24—25	30—32
Mucor erectus Bainier	3—4	20—25	30—32
M. griseo-ochraceus Naumov	4—6	20—25	35
M. plumbeus Bonord.	4—5	20—25	35
M. pusillus (Lindt) Hagem.	6—8	37—40	56—60
M. racemosus. Fres.	— 3, — 4	22—25	30—33
Paecilomyces arenarius (Schap. et Manteif.) Panass	— 2	35—40	45—48
Penicillium cesiae Bainier et Sartory	— 3	24—25	30—35
P. chrysogenum Thom	— 4	25—28	32—33
P. digitatum Sacc.	— 3	20—25	32—33
P. expansum Link.	— 3	25—26	33—35
P. glauco-griseum Sopp.	— 3	20—24	37
P. italicum Wehmer	— 3	22—24	32—34
P. luteum Zukal.	— 2	20—24	35
Rhizopus arrhizus Fischer	6—8	35—36	43—44
Rh. nigricans Ehrenb.	5—6	26—29	32—34
Rh. nodosus Namysl.	5—6	36—38	43—45
Rh. orysae Went., Prins. Geerl.	7—9	36—38	43—45
Sclerotinia Libertiana Fuckel	—1	22—25	30—32
Stachybotrys alternans Bonord	2—3	25—27	37—40

В табл. 1 приведены установленные нами кардинальные температурные точки для некоторых плесневых грибов. Эти температурные точки являются точками развития их.

Плесневые грибы очень чувствительны к температуре выше максимальной (к супрамаксимальной). При этом чувствительность их изменяется в зависимости от наличия воды в их клетках и в окружающей атмосфере, а чувствительность спор зависит еще и от их возраста. Этим, очевидно, и объясняются имеющиеся по этому вопросу в литературе противоречия. Так, например, по Саксу споры Penicillium glaucum (?), Rhizopus nigricans погибают при нагревании их до 82—84°, тогда как по Тому [22] конидии видов Aspergillus и Penicillium и споры Mucor погибают при нагревании их до 125°.

Проведенные нами опыты по выяснению действия супрамаксимальных температур на конидии плесневых грибов подтвердили в основном данные Тома. При прогревании в жидкостях конидии плесневых грибов гораздо более чувствительны к супрамаксимальным температурам, чем при прогревании сухим жаром.

При установлении действия супрамаксимальных температур конидии плесневых грибов отделялись нами от мицелия при помощи узкого металлического шпателя и переносились в заранее простерилизованные тонкостенные пробирки, которые после этого помещались в нагретый до определенной температуры сушильный электрический шкаф, в котором выдерживались 30 мин. или 1 час. В другом случае конидии прогревались в таких же пробирках, содержащих небольшое количество стерильной воды. Пробирки с конидиями погружались на 30 мин. в заранее нагретую до определенной температуры водяную баню и после прогрева охлаждались погружением в холодную воду. Небольшое количество прогретых сухим жаром конидий или же 1 см³ взвеси прогретых в воде конидий вносились в расплавленный и охлажденный до 40° сусло-агар и высевались разливкой в чашки Петри. Конидии для опытов брались 30-дневного возраста. Температуры испытывались с интервалом в 5°. Результаты этих опытов приведены в табл. 2.

Таблица 2

Летальные температуры для конидий плесневых грибов

Название грибов	Время прогрева в мин.	Летальная температура при действии сухим жаром в °С	Время прогрева в мин.	Летальная температура при прогревании в воде в °С
Aspergillus amstelodami (Mangin)	60	120	30	80
A. candidus Link	60	120	30	80
A. clavatus Desm.	60	120	30	80
A. flavus Link	60	120	30	80
A. fumigatus Fres.	60	120	30	85
A. niger v. Tiegh.	60	120	30	85
A. nidulans (Eidam) Winter	60	120	30	80
A. versicolor (Vuill.) Tirab.	30	110	30	75
A. Wentii Wehmer	30	100	—	—
Alternaria tenuis Nees	30	100	—	—
Botrytis allii Munn	30	100	30	65
B. cinerea Pers.	30	100	30	65
Cladosporium herbarum Link.	60	120	30	80
Fusarium moniliforme Sheld.	60	110	30	75
Lichteimia corymbifera (Cohn)	60	120	30	85
Monilia albo-violacea Panass	30	120	—	—
M. sitophila (Mont) Sacc	60	120	30	80
Mucor pusillus (Lindt) Hagem.	60	120	—	—
M. racemosus Fres.	60	120	30	80
Penicillium chrysogenum Thom	30	110	30	80
P. crateriforme Abbott	30	110	—	—
P. digitatum Sacc.	30	110	30	75
P. Duclauxi Delacr	60	120	30	80
P. italicum Wehmer	60	120	—	—
P. luteum Zukal	30	120	—	—
P. puberulum Bainier	30	110	30	80
P. purpurogenum Fleroff-Stoll	60	120	30	75
P. rubrum Stoll	30	120	—	—
P. rugulosum Thom	30	110	30	80
P. spinulosum Thom	30	110	30	80
Rhizopus arrhisus Fischer	60	120	—	—
Rh. nigricans Ehrenb	30	120	30	75
Scopulariopsis brevicaulis (Sacc.)	30	90	30	85
Stachybotrys alternans Bonord.	10	120	30	85
Trichoderma lignorum (Tode) Harz	30	120	30	75
Trichothecium roseum Link.	30	120	30	75

Знание летальных супрамаксимальных температур даст возможность применить термические способы борьбы с плесневыми грибами на тех продуктах, которые могут выдерживать термическое воздействие. К таким продуктам относятся галеты, сухари, фруктовые соки и пр.

Влажность

Вторым фактором, оказывающим решающее влияние на развитие плесневых грибов, является влажность. Границы влажности, в которых возможно развитие плесневых грибов, гораздо более узки, чем температурные границы.

Влияние влажности изучалось многими исследователями: Том и Щау (Thom a. Shaw [20]), Грум и Пениссет (Groom a. Panisset [12]), Блохвиц (Blochwitz [10]), Гейнтцелер (Heintzeler [13]), Шарп и Стеварт и др. (Sharp a. Stewart [19]).

Гейнтцлер делит плесневые грибы на три группы:

1) ксерофильные, развивающиеся при относительной влажности воздуха ниже 80%;

2) мезофильные, развивающиеся при относительной влажности воздуха 80—90%;

3) гигрофильные, развивающиеся при относительной влажности выше 90%.

Подобная группировка не отображает существующих в природе отношений этих организмов к условиям влажности, так как мы имеем дело не с «любовью», а с той или иной степенью приспособленности и стойкости к различным условиям влажности.

Мы делим эти организмы по их отношению к условиям влажности на:

1) гигротолерантные, развивающиеся при 90—100% относительной влажности воздуха;

2) мезогигротолерантные, развивающиеся при 80—90% относительной влажности воздуха;

3) ксеротолерантные, развивающиеся при 65—80% относительной влажности воздуха.

Данная группировка, как и всякая другая попытка расчленения непрерывного ряда степеней приспособляемости организмов к условиям внешней среды, также не отображает действительного положения вещей и является лишь некоторым приближением к такому отображению.

В особенно тесной зависимости от степени влажности воздуха находится процесс прорастания спор плесневых грибов.

По нашим наблюдениям, при 100% относительной влажности воздуха конидии большинства видов Aspergillus, Penicillium и других родов дают ростки уже через 12—20 час. При 90% относительной влажности воздуха конидии дают ростки лишь на 2-й день, а при 80% относительной влажности воздуха конидии многих видов не проросли, конидии же Aspergillus herbariorum A. chevalieri проросли на 3-й день, конидии A. candidus — на 7-й день, а A. nidulans — на 11-й день.

Однако дальнейшее развитие плесневых грибов при разных влажностях проходит по-разному. Вообще для каждой стадии развития плесневых грибов существуют свои определенные кардинальные точки относительной влажности воздуха. В табл. 3 приводятся установленные нами минимальные и оптимальные точки относительной влажности воздуха для развития некоторых плесневых грибов.

Для установления этих точек мы пользовались камерами Ван-Тигема (размером d-20 мм, h-10 мм), в которые помещалась либо дестиллированная вода, либо разной концентрации серная кислота (Наумов, [2]) в количестве 3—5 капель. Снизу на покровное стекло камеры наносилось небольшое количество сусло-агара и на него отвивались конидии испыты-

Таблица 3

Кардинальные точки относительной влажности воздуха для развития плесневых грибов

Название грибов	Минимальная относительная влажность воздуха в %			Оптимальная относительная влажность воздуха в %		
	вегетативное развитие	образование конидий	сумчатая стадия	вегетативное развитие	образование конидий	сумчатая стадия
Aspergillus candidus Link.	75	80	—	90	90	—
A. chevalieri (Mangin)	65	75	86	90	92	92—95
A. clavatus Desm.	88	90	—	98	98—100	—
A. flavus Link.	80	85	—	95	95—96	—
A. fumigatus Fres.	85	90	—	98	98—99	—
A. herbariorum (Mangin)	65	75	86	90	90	92—95
A. nidulans (Eidam)	80	85	95	95	95—98	97—99
A. niger v. Tiegh	88—89	92—95	—	96—98	96—98	—
A. ochraceus Wilhelm	80	85	—	95	95—98	—
A. versicolor (Vuil)	75	80	—	95	95—97	—
Alternaria tenuis Nees	85	90	—	98	98—99	—
Botrytis allii Munn	93—95	95	—	98—100	98—100	—
B. cinerea Pers	93—95	95	—	100	—	—
Beauveria Bassiana (Bals.) Vuill.	85—88	92—94	—	95—97	98—99	—
Cladosporium herbarum (Pers.)	85—86	88—90	—	95—96	96—98	—
Cunninghamella echinata Pispek	86—88	88—90	—	96—98	98—99	—
Lichtheimia corymbifera (Cohn)	88—89	90—92	—	96—98	96—98	—
Monilia sitophila (Mout.) Sacc	88—90	90—92	—	95—98	98—99	—
Mucor racemosus Fres.	92	95	—	98	98—99	—
M. berolinensis Naumov	88—90	94—96	—	98	98—99	—
Penicillium chrysogenum Thom.	85	86	—	96	98	—
P. crateriforme Abbott.	85	88	—	95	98	—
P. expansum (Link.) Thom.	82	85	—	95	95—97	—
P. italicum Wehmer	87	89	—	96	96—98	—
P. lilacinum Thom.	90—92	95	—	98	98—99	—
P. rugulosum Thom.	80	85	—	96—96	96—98	—
P. rubrum Stoll.	86	90	—	95	98	—
P. spinulosum Thom.	80	84	—	95	95—96	—
Rhizopus nigricans Ehrenb.	92—94	96	—	98	98—99	—
Scopulariopsis brevicaulis (Sacc.) B. et S.	85	86	—	92—95	95—96	—
Stachybotrys alternaris Bonord.	93—95	95—96	—	99—100	99—100	—
Thamnidium elegans Link.	92—94	95—96	—	98	98—100	—
Trichoderma lignorum (Tode) Harz	92	95	—	96—98	98—99	—
Trichothecium roseum Link.	86—88	92	—	96	96—98	—

ваемых плесневых грибов. Наблюдения за камерами в первые 10—15 дней проводились ежедневно, а после этого срока — через день.

Как видно из приведенной таблицы, к ксеротолерантной группе относятся: Aspergillus candidus, виды A. glaucus, A. versicolor.

К мезогигротолерантной группе относятся: Alternaria tenuis, Aspergillus flavus, A. fumigatus, A. nidulans, A. ochraceus, а также большинство видов Penicillium.

К гигротолерантной группе относятся Aspergillus clavatus, A. niger, виды Botrytis, Mucorales, Penicillium lilacinum, Stachybotrys alternans, Trichoderma lignorum.

Наличие в производственных или природных условиях той или иной из приведенных здесь групп грибов может служить хорошим индикатором степени влажности воздуха.

Из табл. 3 видно, что особенно узкие пределы влажности существуют для развития сумчатой стадии плесневых грибов. Такие же результаты получил и Шварц (Schwartz, [18]) установивший, что у Aspergillus glaucus клейтокарпии развиваются при относительной влажности воздуха 90—100%.

По имеющимся в литературе данным, а также по нашим наблюдениям, плесневение разнообразных продуктов, сырья и фабрикатов именно и начинается развитием грибов групп Aspergillus glaucus, A. candidus, A. versicolor. Так, по данным Тома и ле Февра (Thom a. Le Fevre, [21]), плесневение муки начинается развитием Aspergillus repens при содержании в ней 13% влаги. По нашим наблюдениям (Панасенко и Московець [3]), Aspergillus candidus развивается в муке при содержании в ней 14% влаги; по Раутенштейну [5] плесневение зерна начинается с развития Aspergillus repens при влажности зерна не ниже 15,5%. По данным Кёлера, плесневение зерна кукурузы тоже начинается с развития грибов группы Aspergillus glaucus при содержании в зерне 14,3% влаги.

При высокой относительной влажности воздуха на тех же объектах развивается иная флора. В солодовнях пивных заводов, где относительная влажность воздуха очень высокая, на ячмене развиваются главным образом виды Rhizopus, Aspergillus clavatus, реже виды Penicillium; грибы ксеротолерантной группы не встречаются.

Концентрация сахаров и солей

Степень развития плесневых грибов на разного рода продуктах и объектах обусловливается наличием, кроме влаги, также разной концентрации сахаров и солей, создающих определенное осмотическое давление. При этом, как показали опыты Перешивайло [1], на развитие плесневых грибов оказывает влияние не только концентрация сахара, но и природа его.

Еще большее влияние оказывает концентрация сахаров на образование плесневыми грибами органов воспроизведения (Чона, Chona [11]).

Среди плесневых грибов известно лишь немного таких, которые могут развиваться только при наличии высоких концентраций сахаров и солей. К ним относится, например, описанная ван-Беймом (van Beyma [9]) Oospora halophila, развивающаяся лишь при содержании в среде 50% поваренной соли, Torula Nikitinski (Malev.) Panass., растущая на средах с высокой концентрацией сахаров и солей, и некоторые другие виды.

Некоторые плесневые грибы очень стойки по отношению к солям, являющимся для других организмов ядовитыми. Например, Трабу выделил из 9,5% раствора медного купороса Penicillium cupricum, Локвуд (Lockwood [16]) — из 9% раствора уксуснокислого натрия выделил Penicil-

[1] С. И. Перешивайло. Влияние концентрированных растворов сахарозы, глюкозы и инвертного сахара на развитие плесневых грибов (рукопись).

lium italicum, из 20% раствора NH_4NO_3 и 10% раствора NaCl он неоднократно выделял виды группы Aspergillus glaucus, A. flavus, а из 30% раствора KNO_3 A. fumigatus.

Реакция среды

Кислотность среды не играет большой роли в развитии плесневых грибов, хотя большинство из них лучше развивается в кислой среде, чем в щелочной. В процессе развития многих плесневых грибов кислотность среды очень сильно колеблется, так как, с одной стороны, они сами могут продуцировать органические кислоты, а с другой стороны, при отсутствии в среде иного источника углерода, они могут усваивать углерод органических кислот. Разные виды плесневых грибов имеют различные оптимальные и различные крайние точки кислотности среды, при этом на разных стадиях развития отношение плесневых грибов к реакции среды бывает разное. Приводим крайние точки pH для некоторых плесневых грибов.

Название гриба	Крайние точки pH
Aspergillus candidus	От 2,07 до 7,7
A. niger	» 1,5 » 9,8
A. repens	» 1,8 » 8,45
Botrytis cinerea	» 2,0 » 8,0
Cladosporium herbarum	» 3,1 » 7,7
Mucor racemosus	» 2,0 » 8,45
Penicillium cyclopium	» 2,0 » 10,0
P. italicum	» 1,6 » 9,8
P. luteum	» 1,4 » 8,3
P. pfefferianum	» 1,4 » 8,4

Изменение реакции среды очень сильно отражается на энзиматической деятельности плесневых грибов, так как большинство энзимов очень чувствительно к концентрации водородных ионов.

Анаэробиоз

Несмотря на то, что некоторые плесневые грибы частично проявляют анаэробные свойства, переходя при отсутствии кислорода воздуха к интрамолекулярному дыханию или же к брожению, в литературе существует мнение о их строгом аэробиозе. Между тем установлено, что такие плесневые грибы, как Aspergillus, Mucor, Penicillium и др., могут некоторое время развиваться без кислорода воздуха, при условии наличия в среде сахаров, вызывая в этих условиях спиртовое брожение. Костычев, работая с Penicillium glaucum (?), установил, что у этого организма интрамолекулярное дыхание может продолжаться несколько дней, по прошествии которых выделение CO_2 прекращается, и гриб погибает. Нами было посеяно 16 видов плесневых грибов (Aspergillus, Mucor, Penicillium) в жидкую среду Чапека с тростниковым сахаром, разлитую по 10 см³ в большие пробирки, после чего поверхность среды покрывалась слоем стерильного вазелинового масла высотой в 1 см. Уже на 5-й день все грибы дали в среде взвесь белого хлопьевидного мицелия без всяких следов репродуктивных органов. Между средой и слоем масла во многих пробирках образовались пузырьки газа. Через две недели все посеянные нами грибы проросли по стенкам пробирок чрез слой масла и образовали конидиеносцы с конидиями или же спорангиеносцы со спорангиями. Эти же виды грибов через некоторое время были поставлены в атмосферу водорода. Для этого они отвивались на сусло-агар в пробирки с очень рыхлыми ватными пробками. Пробирки помещались в эксикатор, после чего крышка его замазывалась менделеевской замазкой. Из эксикатора при помощи вакуум-насоса выкачивался воздух, и он заполнялся водородом; после этого водород выкачивался, и эксикатор снова заполнялся

водородом; затем кран эксикатора закрывался и тоже замазывался менделеевской замазкой. В одород перед введением в эксикатор пропускался для очищения через ряд поглотителей.

Результаты опыта приводятся в табл. 4. Длительность опыта 35 дней.

Таблица 4

Развитие плесневых грибов в атмосфере водорода

Название грибов	Степень развития грибов за 35 дней роста
Aspergillus clavatus	Вся поверхность агара покрывалась мучнисто-белым налетом, состоящим из конидиеносцев со стеригмами, но без конидий
A. flavus	На агаре развились слабые дерновинки, всего около 4 мм в диаметре, состоящие из субстратного и лишь незначительно развитого воздушного мицелия. Конидиеносцы не развились
A. fumigatus	Развился только погруженный мицелий, всего 3 мм в диаметре
A. nidulans	Образовались слабо развитые дерновинки около 4 мм в диаметре с воздушным мицелием до 1 мм высоты. Конидиеносцы не развились
A. niger	На поверхности агара образовались мучнисто-белые дерновинки около 5 мм в диаметре
A. repens	Развитие почти отсутствует. На поверхности агара образовались слизистые точки в местах укола иглой около 1 мм в диаметре
Mucor racemosus	Вся поверхность агара покрывалась слизистыми колониями типа дрожжевых. При рассматривании этих колоний в микроскоп обнаружилось, что они состоят из снабженных перегородками гиф, среди которых изредка встречаются простые спорангиеносцы с верхушечными спорангиями. Спорангии имели столбик, всего лишь 2—3 споры и зернистую протоплазму
Lichtheimia corymbifera	Образовались слизистые дерновинки до 5 мм в диаметре. Спорангиеносцы не развились
Penicillium chrysogenum	На поверхности агара образовались небольшие, около 5 мм в диаметре, дерновинки с незначительно развитыми пучками серовато-белого мицелия
P. expansum	Образовались слизистые дерновинки около 5 мм в диаметре. Конидиеносцы не развились
P. italicum	Дерновинки около 5 мм в диаметре и с воздушным мицелием до 1 мм высоты
P. lilacinum	За 35 дней дал слизистые дерновинки, состоящие только из субстратного мицелия, всего около 3 мм в диаметре. В поставленной одновременно в атмосферу водорода пробирке с развившимся грибом через 35 дней мицелий гриба превратился в слизистую массу
P. luteum	Образовал беловатые дерновинки около 3 мм в диаметре со слабо развитым воздушным мицелием
P. puberulum	Дерновинки около 5 мм в диаметре с небольшими пучками воздушного мицелия. Конидиеносцы и конидии не развились
P. spinulosum	Развился только субстратный мицелий до 3 мм в диаметре
Scopulariopsis brevicaulis	То же

После 35-дневного пребывания в атмосфере водорода все пробирки были поставлены в термостат при 25°. При этом оказалось, что некоторые виды рода Aspergillus погибли, виды же рода Penicillium развились, но не все в одинаковой степени. Penicillium expansum развился нормально, дав большое количество конидий и коремий. P. italicum дал пышный белый мицелий с небольшим количеством конидий, а P. lilacinum дал белый воздушный мицелий совершенно без конидиеносцев и конидий.

Таким образом, мы видим, что в жидкостях плесневые грибы могут развиваться без доступа воздуха, но репродуктивных органов в этих условиях совершенно не образуют. В атмосфере водорода они либо совершенно не развиваются, либо дают незначительное развитие стерильного мицелия и изредка конидиеносцев. Конидий в этих условиях они совершенно не дают.

Свет в развитии плесневых грибов значительной роли не играет, и большинство из них развивается одинаково хорошо как в темноте, так и на свету. По Сабет (I. S. Sabet, [17]), солнечный свет стимулирует развитие Penicillium egyptiacum, а по Вестону (Weston [23]), солнечный свет стимулирует спорообразование и образование пигмента у Helminthosporium, Alternaria Solani. По Чона [11], яркий солнечный свет подавляет прорастание конидий, вегетативное развитие и образование клейстокарпиев у видов группы Aspergillus glaucus, но стимулирует образование конидий.

Влияние экологических факторов на морфологические и культуральные признаки плесневых грибов

Несмотря на важность вопроса о влиянии экологических факторов на морфологические и культуральные признаки плесневых грибов, в литературе имеется сравнительно небольшое количество работ, посвященных ему; вследствие этого многие экотипы плесневых грибов, как и других низших организмов, нередко описываются как новые виды. Из работ по этому вопросу необходимо отметить работу Райлло [4] и статью Деняк [1].

По наблюдениям Деняк, температура оказывает большое влияние на пигментообразование у видов Fusarium, а степень влажности отражается на форме и размерах конидий.

Наши данные касаются главным образом грибов семейства Aspergillaceae. На культуральные и морфологические признаки этих грибов оказывают большое влияние как состав среды, так и температура и влажность воздуха. Особенно большое влияние оказывает в этом отношении концентрация в среде сахаров. Например, виды группы Aspergillus glaucus на агаре Чапека с 40% тростникового сахара совершенно изменяют свои культуральные признаки. Конидии у них образуются в очень незначительном количестве, но клейстокарпии развиваются в массовом количестве, и дерновинки приобретают поэтому серо-желтую окраску. Такие же результаты получил и Чона в отношении этих организмов. Однако A. nidulans на этой среде дал только конидии, клейстокарпии же совершенно не развились. Aspergillus candidus, A. flavus, A. versicolor на этой среде развивались очень плохо, при этом окраска A. flavus из желтовато-зеленой изменилась в чисто зеленую, а A. ochraceus приобретал окраску нежно-кремового цвета.

Очень сильно влияет на изменение культуральных признаков и чрезмерная концентрация таких элементов, как Cu, Fe, Zn и др. Например, Aspergillus nidulans на сусло-агаре с 0,3% $CuSO_4$, хотя и развивался, но клейстокарпиев не дал, а Penicillium chrysogenus, P. expansum, P. puberulum на сусло-агаре с 2% $FeSO_4$ развились, но конидий не дали совершенно.

Реакция среды оказывает большое влияние на пигментообразование плесневых грибов; например, многие виды Fusarium в кислой среде имеют

красную окраску, а в щелочной — голубую; по данным Ротмистрова [6], Aspergillus repens на среде с pH=5,0—6,0 имеет дерновинки зеленые, а при pH=7,0—темнобурые.

Температурный фактор также оказывает влияние на культуральные и морфологические признаки плесневых грибов.

Низкая температура либо совершенно подавляет их развитие, либо они развиваются, но культуральные признаки их очень изменяются. Например, Penicillium chrysogenum, P. italicum, P. puberulum и др. при 0° дают шерстистые, белые, почти без конидий дерновинки. P. italicum при +5° дает прекрасные коремии, тогда как при 20—25° они у него не образуются. Fusarium reticulatum, F. sambucinum, F. sporotrichioides при 0° за $2^1/_2$ мес. дали лишь слабо развитую плектенхиматическую строму без воздушного мицелия и конидий. Thamnidium elegans при —2° за 25 дней развития дал очень низкие дерновинки. Спорангиеносцы его вместо нормального дихотомического ветвления имели ветвление моноподиальное. Спорангиоли он дал многоспоровые, 45—75 μ в диаметре, вместо нормальных 20—30 μ в диаметре. Температуры, близкие к максимальным, подавляют процесс спорообразования плесневых грибов.

Наиболее значительные видоизменения морфологических признаков происходят под влиянием относительной влажности воздуха. По Клебсу (Klebs [14]), слишком высокая влажность воздуха задерживает развитие мицелия плесневых грибов, а также процесс образования репродуктивных органов.

По нашим наблюдениям, плесневые грибы неодинаково реагируют на высокую относительную влажность воздуха. Aspergillus candidus при 100% относительной влажности воздуха дает головки мелкие, редуцированные до 2—3, а иногда и до 1 стеригмы, образующие всего по 2—3 конидии. Aspergillus chevalieri при этой влажности имеет конидиеносцы почти без пузырька, а находящиеся на них стеригмы часто бывают разветвленные и тоже образуют цепочки по 2—3 конидии. Aspergillus herbariorum имеет в этих условиях конидиеносцы с небольшим количеством сильно удлиненных стеригм, равных по длине конидиеносцу и либо остающихся стерильными, либо образующих незначительное количество конидий. Aspergillus versicolor при 100% относительной влажности воздуха тоже имеет головки редуцированные, а стеригмы с небольшим количеством конидий.

С другой стороны, такие виды, как Aspergillus clavatus, A. fumigatus, A. niger, A. ochraceus, при 100% относительной влажности воздуха дают вполне нормальные головки.

Не менее значительные видоизменения при 100% относительной влажности воздуха претерпевают виды Penicillium. Например, P. chrysogenum, P. italicum и др. при этой влажности дают ненормальные кисточки, редуцированные до одно-, реже до двухярусных или же до одной стеригмы, которая отчленяет короткие цепочки конидий.

Таковы в общих чертах наблюдавшиеся нами видоизменения морфологических и культуральных признаков, происходящие под влиянием экологических факторов. Дальнейшие исследования в этом направлении дадут, безусловно, много ценных фактов, которые помогут разобраться в сложных вопросах таксономии плесневых грибов.

Выводы

1. Основными экологическими факторами, влияющими на развитие плесневых грибов, являются температура и относительная влажность воздуха.

2. На основании разного отношения к температурному фактору разделяем плесневые грибы на три группы:

а) психротолерантная, к которой относятся виды, могущие развиваться при отрицательных температурах;

б) мезотолерантная группа, включающая виды, развивающиеся при температурах в среднем от +5 до +30°;

с) термотолерантная группа, к которой относятся виды плесневых грибов, могущие развиваться еще при 40—50°.

3. Развитие плесневых грибов возможно в температурных границах от —7 до +60°.

4. Летальные температуры для конидий плесневых грибов при сухом прогревании в течение 0,5—1 часа колеблются от 100 до 120°, а при прогревании в воде в течение 0,5 часа колеблются от 65 до 85°.

5. Возможно применение супрамаксимальных температур в качестве меры борьбы с плесневыми грибами на тех продуктах и предметах, которые при нагревании не изменяются.

6. Существующее разделение плесневых грибов на основании отношения их к влажности на группы ксерофильную, мезофильную и гигрофильную мы считаем не соответствующим имеющимся в природе соотношениям. Мы предлагаем следующее разделение:

а) ксеротолерантная группа, к которой относятся организмы, развивающиеся при 65—80% относительной влажности воздуха;

b) мезогигротолерантная группа, к которой относятся организмы, развивающиеся при 80—90% оносительной влажности воздуха;

с) гигротолерантная, к которой относятся организмы, развивающиеся при 90—100% относительной влажности воздуха.

7. В жидкой среде с сахаром, покрытой слоем вазелинового масла, плесневые грибы могут развиваться без кислорода воздуха, но репродуктивных органов в этих условиях они совершенно не образуют.

На сусло-агаре в атмосфере водорода некоторые из плесневых грибов совершенно не развиваются, а некоторые дают слабое развитие стерильного мицелия и лишь изредка конидиеносцы, но конидий в этих условиях они совершенно не дают.

После 35-дневного пребывания в атмосфере водорода A. repens погиб.

8. Экологические факторы оказывают чрезвычайно большое влияние на культуральные и морфологические признаки плесневых грибов. Низкая температура подавляет процесс спорообразования у плесневых грибов, вызывает образование коремий у некоторых видов Penicillium и пр.

9. Высокая относительная влажность воздуха подавляет вегетативное развитие плесневых грибов и ведет к редукции органов спороношения типа регрессивного метаморфоза.

Укр. Научно-исследовательский институт
пищевой промышленности
Харьков

Получено 4. V. 1941

ЛИТЕРАТУРА

1. Деняк В. І. Вплив температури і відносної вологості повітря на мінливість діагностичних ознак. Fusarium solani (Mart.) App. et Wr. і Fusarium culmorum. (W. Sm.) Sacc. Мікроб. журн. Акад. Наук УССР, т. V, № 1, стр. 175, 1938.
2. Наумов Н. А. Методы микологических и фитопатологических исследований, 1933, стр. 41.
3. Панасенко В. Т. та Московець С. М. Вплив комплексу грибків фізаріозної кукурудзи на сировину кобмікормів. «Фузаріозна кукурудза в комбікормах», Київ, 1938, стр. 19.
4. Райлло А. И. Диагностическая оценка морфологических и культурных признаков у видов рода Fusarium. Ленинград, 1935.
5. Раутенштейн Я. И. Самонагревание пшеницы и роль микроорганизмов в этом процессе. Микробиология, т. VIII, вып. 5, стр. 555, 1939.
6. Ротмистров, М. Н. Морфолого-систематичне і фізіслогічне вивчення мікофлори фруктових кондитерських виробів і півфабрикатів. Харків, 1937. Вид. Урк. Н. И. Ин-та пищев. промышл.
7. Ячевский А. А. Основы микологии, 1933.

8. Brooks F. T. and Hansford C. G. Mould growth upon cold-store meat. The Brit. Mycol. Soc. Trans. v. VIII, p. 113, 1923.
9. Beyma F. H. Beschreibungen einiger neuer Pilzarten aus dem Centralbureau vor Schimmelkultures Baarn. Cbl. Bakt., II. Abt., Bd. 88, S. 132, 1933.
10. Blochvitz A. Standorte u. geographische Verbreitung der Schimmelpilze Aspergillaceae, Ann. Mycol., v. XXVIII, S. 241, 1930.
11. Chona B. L. The effect of cultural conditions on the growth and sporulation of an organism belonging to the group species Aspergillus glaucus, The Brit. Mycol. Soc. Trans., v. XVII, p. 221, 1932.
12. Groom P. and Panisset Th. Studies on Penicillium crysogenum in relation to temperature and relative humidity of the air. The Ann. Appl. Biol., v. XX, p. 633, 1933.
13. Heintzeler J. Das Wachstum der Schimmelpilze in Abhängigkeit von den Hydraturverhältnissen unter verschiedenen Aussenbedingungen, Arch. Mikrob., X, S. 92, 1939.
14. Klebs G. Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen, Jena, 1928.
15. Koehler B. Fungus growth in shelled corn as affected by moisture. J. Agr. Res., LVI, 4, p. 291, 1938.
16. Lockwood L. B. Fungi from laboratory reagents. Mycologia, No. 1, т. 10, 1936.
17. Sabet J. S. Contributions to the study of Penicilium egyptiacum v. Beyma. Trans. Brit. Mycol. Soc., v. XXI, p. 198, 1938.
18. Schwartz W. Entwicklungsphysiologische Untersuchungen über die Gattung Aspergillus und Penicillium, Flora, Bd. XXIII, H. 4, S. 386, 1928.
19. Sharp P. F. and Stewart G. F. Effect of relative humidity on the growth of mold on eggs in storage. Corn. Univ. Agric. Exp. Sta Mem. 191, New York, 1936.
20. Thom Ch. and Shaw R. H. Moldiness in butter, J. Agric. Res. v. III, No. 4, p. 301, 1915.
21. Thom Ch. and Le Fevere, Flora of corn meal. J. Agric. Res., v. XXII, No. 4, p. 179, 1921.
22. Thom Ch. and Church M. The Aspergilli. 1926.
23. Weston, D. W. A. K. The sporulation of Helminthosporium avenae and Alternaria Solani on artificial culture. The Brit. Mycol. Soc. Trans., v. XX, p. 112, 1936.

THE ECOLOGY OF MOLDS

V. T. Panassenko

Summary

1. Temperature and relative humidity of the air are the principal factors affecting the development of molds.

2. The molds can be divided into three groups according to their behaviour with regard to temperature:

a) psychrotolerant — here belong species that develop at negative temperatures;

b) mesotolerant — here belong species developing at +5—+30°;

c) thermotolerant —to this group belong mold species that still develop at 40—50°.

3. The development of molds is possible within the temperature range of —7—+60°.

4. The lethal temperatures for the conidia of molds upon dry heating during 0.5—1 hour vary from 100 to 120°, and upon heating in water during 0.5 hour they vary from 65 to 85°.

5. Supramaximal temperatures can be used as a method of combating molds on those food-stuffs and objects that are not affected by heating.

6. The current classification of the molds as based on their behaviour with regard to humidity, *viz.* xerophile, mesophile and hydrophile, does not conform with the relations actually existing in nature. The following is the classification suggested by the writer:

a) xerotolerant group to which belong the organisms developing at 65 — 80% relative humidity of the air;

b) mesohygrotolerant group to which belong the organisms developing at 80—90% relative humidily of the air;

c) hygrotolerant to which belong the organisms developing at 90—100% relative humidity of the air.

7. In a liquid sugar-containing medium coated by a film of vaseline oil the molds can develop without oxygen of the air but develop no reproductive organs at all.

On brew-agar in hydrogen certain molds do not develop at all while some show slight development of a sterile mycelium and only occasionally condiophores but no conidia at all.

After 35 days exposure to hydrogen A. repens succumbed.

8. The ecological factors exercise an extremely great influence upon the cultural and morphological characters of the molds. Low temperature inhibits sporulation the molds and induces the formation of coremia in some Penicillium species a. o.

9. High relative humidity of the air inhibits the vegetative development of the molds, and causes a reduction of the sporulation organs of the type of regressive metamorphosis.

The Ukrainian Research Institute
of Food industry
Kharkov

К БИОХИМИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКЕ СПОРОНОСНЫХ БАКТЕРИЙ, ОБРАЗУЮЩИХ ГРАМИЦИДИН

А. С. Коникова, Р. М. Азарх, Е. И. Блинникова и *Н. Н. Добберт*

Многими исследователями, работавшими над проблемой антагонизма микробов, было отмечено антагонистическое действие аэробных спороносных бактерий на гноеродные кокки (Николь, Nicolle [11], Прингсхейм, Pringsheim [12], Розенталь, Rosental [14] и др. [5, 9]). Изучение этого феномена с химической стороны было начато исследованиями Дюбо и его сотрудников, которые в 1939 г. впервые выделили [1], а в 1940 г. [5, 6] изолировали в чистом виде антагонистически действующее вещество и тем самым установили связь между бактерицидной функцией микробной клетки и определенными химическими соединениями.

В 1939 г., путем двухлетнего выращивания микробной флоры образцов почвы на патогенных кокках в качестве питательной среды, Дюбо (Dubos) отобрал штамм спороносного аэроба, отнесенный им на основании морфологических и культуральных признаков к виду Bacillus brevis, из культуры которого он посредством подкисления среды до pH =4,5 выделил белок-содержащую фракцию с выраженной бактериостатической активностью в отношении грам-положительных микробов. Из этой фракции посредством экстракции спиртом или ацетоном удалось получить без потери активности свободное от белка действующее начало, выделенное в виде аморфного порошка. Это вещество было названо Дюбо т и р о т р и ц и н о м.

В 1940 г. Гочкис и Дюбо выделили из тиротрицина два кристаллических вещества, отличающихся друг от друга химическими свойствами и действием на бактерии. Одно из них — г р а м и ц и д и н — представляет собой циклический полипептид, в состав которого входят: *l*-аланин, *l*-триптофан, *d*-лейцин, *l*- и *d*-валин, глицин и оксиаминосоединение неизвестного строения, повидимому не являющиеся *α*-аминокислотой [7, 3, 9]. Согласно исследованиям Липмана, Гочкиса и Дюбо (Lipmann, Hotchkiss, Dubos [10]), 45% аминокислот этого полипептида находятся в *d*-форме.

Другое кристаллическое вещество, выделенное из тиротрицина, так называемый т и р о ц и д и н, оказалось незамкнутым полипептидом, обладающим свойствами основания и содержащим свободные аминные и карбоксильные группы. В состав тироцидина входят: диаминокислоты, триптофан, тирозин, аспарагиновая кислота, фенилаланин и аланин [3, 7]. Преобладание диаминокислот придает тироцидину свойства основания. Липман и Дюбо нашли, что 20% *α*-аминокислот этого полипептида находится в *d*-форме.

Оба выделенных полипептида не расщепляются протеолитическими ферментами, повидимому в связи с особенностями конфигурации, определяющейся присутствием в их составе *d*-аминокислот.

Бактерицидное действие грамицидина направлено в основном против грам-положительных микробов, в первую очередь кокков, причем проявляется оно in vitro и in vivo. Тироцидин действует на грам-положительные кокки значительно слабее, однако он оказывает сильное бактерицидное действие на грам-отрицательные бактерии. Тироцидин активен только in vitro; в присутствии крови, сыворотки или различных белков его бактерицидное действие не проявляется. В силу этого он очень быстро теряет свою активность in vivo [13].

Тиротрицин содержит около 20% грамицидина и 50—60% тироцидина. Механизм действия всех трех веществ полностью не изучен. Дюбо непосредственно связывает бактериостатическое действие тиротрицина и грамицидина с тормозящим влиянием этих веществ на глюкозо-дегидразу кокков; тироцидин, согласно указаниям этого автора, тормозит все окислительные процессы микробной клетки [2].

Первый штамм бактерий, образующих грамицидин, Дюбо получил, выращивая спороносную флору в течение двух лет на кокках. Стоксу и Удворду (Stokes a. Woodward [15]) удалось выделить непосредственно из почвы большое количество грамицидинобразующих штаммов антагонистически активных бактерий, пользуясь для их отбора зонами осветления вокруг активных колоний на агаре.

В дальнейшем ряд авторов, в том числе и Дюбо, выделил подобного вида бактерии не только из почвы, но и из сточных вод, сыра и других источников. Повидимому, эти бактерии-антагонисты широко распространены в природе, так же как и грам-положительные кокки, на которых направлено их действие.

Нами изучались некоторые биохимические свойства и особенности культур спороносных аэробов, образующих грамицидин, в целях подбора условий культивирования и обработки, способствующих получению максимального выхода активного вещества; исследовалась также связь между образованием грамицидина в растущих культурах и изменением азотистых фракций среды.

Мы работали с тремя штаммами активных бактерий, а именно: штамм 12_1, выделенный из почвы в Томске Р. В. Фрадкиной, штамм 1 α, полученный также из почвы в Отделе биохимии микробов ВИЭМ проф. З. В. Ермольевой, и американский штамм B G, полученный из лаборатории Дюбо проф. А. А. Смородинцевым и любезно им предоставленный нашей лаборатории.

Все три штамма, являющиеся аэробными спороносными палочками, красятся положительно по Граму в течение первых 18—24 час. роста.

В процессе роста все они щелочат нейтральную мясо-пептонную среду: более подробная характеристика штаммов дана в работе А. П. Уразовой (дисс.) Все три штамма образуют тиротрицин, который нами выделялся по методу Дюбо. Активность выделенного вещества проверялась совместно с Уразовой по действию его на пневмококк, стафилококк и гемолитический стрептококк. Испытание на бактериостатическое действие проводилось на твердой среде по Стокс и Удворду следующим образом: различные количества раствора тиротрицина смешивались с пептонным агаром и выливались на чашки Петри. После застывания агара на чашки засевалась штрихом одна петля 18—24 час. культуры гноеродных кокков (стафилококк, стрептококк, пневмококк). После 24-час. инкубации засеянных чашек учитывались результаты. Выделенный нами тиротрицин полностью тормозил рост стафилококка в концентрации от 25 до 100 γ на 1 см^3 среды в зависимости от штамма стафилококка; в концентрации 5 γ на 1 см^3 среды тормозил рост гемолитического стрептококка и пневмококка.

Кроме того проверялось действие выделенного тиротрицина на глюкозо-дегидразу гноеродных кокков согласно методу, описанному Дюбо. Концентрации тиротрицина, оказывающие тормозящее действие на рост тест-микробов, тормозили также глюкозу-дегидразу этих бактерий.

В случае тормозящего действия тиротрицина на этот фермент в опытной пробе не происходило восстановления метиленовой сини (табл. 1).

Выделение тиротрицина проводилось по методу Дюбо с некоторыми изменениями, на которых мы остановимся ниже.

Культура засевалась на мясопептонный бульон, разлитый в матрасы слоем 1,5—2 см толщины, и инкубировалась при 37°. Шестидневная культура подкислялась концентрированной соляной кислотой до pH=4,5.

Таблица 1

Действие тиротрицина на стафилококк № 21

Дозировка в г/мл	20	40	100	200	Контроль
Рост	+	—	—	—	++++
Восстановление метиленовой сини . .	Частичное восстановление	Нет восстановления	Нет восстановления	Нет восстановления	Полное восстановление

При этом выпадал обильный хлопьевидный осадок (осадок *I*); более сильное подкисление влекло за собою уменьшение осадка и снижение активности препарата.

Согласно нашим наблюдениям, осадок выпадает лучше и жидкость быстро осветляется, если соляную кислоту добавлять к еще теплой культуре бактерий. Через 24 часа после осаждения осадок собирался центрофугированием или фильтрованием. Собранный осадок помещался для экстракции в 96° спирт или в ацетон из расчета 50—60 см³ спирта на 1 л культуры. После 24-час. экстракции нерастворенную часть осадка отфильтровывали.

Прозрачный спиртовый раствор сгущался в вакууме при t 25—30° до помутнения жидкости (примерно до 0,1 объема). Из спиртового экстракта тиротрицин осаждался 10-кратным объемом 1% NaCl (осадок *II*). По нашим наблюдениям, выпадение осадка наступает быстрее и протекает полностью в том случае, если спиртовый раствор приливать по каплям к раствору NaCl при постоянном помешивании. При приливании раствора NaCl к спиртовому раствору тиротрицина иногда образуется стойкая эмульсия.

Осадок *II* после высушивания дважды промывался эфиром, после чего снова высушивался над пятиокисью фосфора в вакуум-эксикаторе.

Все три штамма, с которыми нам приходилось работать, давали резкие колебания количества образованного тиротрицина. Например, штамм 12_1 давал амплитуду выхода тиротрицина от 350 до 70 мг на 1 л культуры, остальные штаммы — в аналогичных пределах.

Пытаясь выяснить факторы, могущие определять количество выделяемого тиротрицина, мы исследовали значение питательной среды, температуры инкубации и влияние некоторых этапов химической обработки на выход этого вещества.

Нами сравнивалось действие ацетона и спирта в качестве растворителей для экстракции тиротрицина из содержащего белок осадка *I*.

С этой целью осадок *I*, полученный путем осаждения соляной кислотой из 2 л культуры штаммов 12_1 и 1_a, делился по весу на две равные части: одна часть помещалась в 50 см³ спирта, другая в такое же количество ацетона. Экстракция продолжалась 24 часа, после чего из экстрактора выделялся осадок тиротрицина. Последний высушивался до постоянного веса над пятиокисью фосфора и взвешивался. Результаты опыта приведены в табл. 2.

Таблица 2

Название штамма	Растворитель	Количество тиротрицина в мг на 1 л культуры
12	Спирт	145
12	Ацетон	138
1_a	Спирт	120
1_a	Ацетон	122

Как видно из данных, приведенных в табл. 2, выход тиротрицина при обработке осадка спиртом и ацетоном одинаков. По активности осадки тоже не отличаются.

Желая выяснить, зависит ли выход тиротрицина от общего количества питательных веществ, находящихся в культуральной среде, мы выращивали наши штаммы на средах с различным содержанием бульона и пептона. Согласно нашим наблюдениям, оптимальным для образования тиротрицина является бульон из мясной воды, разведенной в отношении 1 : 2, с 1% концентрацией пептона.

Разбавление мясной воды в отношении 1 : 3 и 1 : 4 снижает выход тиротрицина; при снижении содержания пептона в культуральной среде до 0,5% выход тиротрицина резко уменьшается.

Увеличение концентрации пептона свыше 1% не повышает выхода тиротрицина.

Исходя из предположения, что незначительное содержание в обычно употребляемой питательной среде *d*-аминокислот и триптофана может лимитировать образование тиротрицина, в состав которого эти вещества входят в большом количестве, мы предположили, что добавление их к питательной среде будет способствовать увеличению образования бактерицидного начала.

Для выяснения этого вопроса нами были посеяны штаммы 1_a и 12_1 на мясопептонный бульон, причем к шести матрасам этой среды было добавлено на 1 л культуры по 33 мг *dl*-лейцина, *dl*-серина и *dl*-аланина. К другим шести матрасам, кроме перечисленных аминокислот, добавлялось еще 33 мг/л *l*-триптофана. Контрольной средой являлся бульон с соответственно увеличенным содержанием органического азота (добавочный пептон). Полученные результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3

Изменение количества тиротрицина в зависимости от состава среды

Штамм	Среда	Количество тиротрицина в мг на 1 л культуры	% повышения выхода
12_1	Мясопептонный бульон	72	—
12_1	Мясопептонный бульон + *dl*-аланин + *dl*-лейцин + *dl*-серин	114	58
12_1	Мясопептонный бульон + *dl*-аланин + *dl*-лейцин + *dl*-серин + *l*-триптофан	111	54
1_a	Мясопептонный бульон	65	—
1_a	Мясопептонный бульон + *dl*-аланин + *dl*-лейцин + *dl*-серин	105	61
1_a	Мясопептонный бульон + *dl*-аланин + *dl*-лейцин + *dl*-серин + *l*-триптофан	108	66

Как видно из приведенных результатов, в данном опыте выход сухого тиротрицина из культуры обоих штаммов, растущих на мясопептонном бульоне, низкий.

В этом случае добавление к среде *d*-аминокислот повышает выход вещества на 58—61%. Добавление триптофана к среде, уже содержащей *dl*-аминокислоты, не влечет за собой дальнейшего повышения выхода тиротрицина.

Работая с грамицидинобразующими штаммами, мы наблюдали, что иногда происходят такие изменения культур, в результате которых в процессе выделения тиротрицина, несмотря на образование достаточного количества белоксодержащего осадка *I* (сухой вес около 1 г на 1 л куль-

туры), совсем не выпадает осадок *II*, получаемый при добавлении электролитов к спиртовому экстракту из осадка *I*. В таких случаях мы определяли активность различных фракций, получающихся в ходе обработки культуры, для получения тиротрицина. По методу Стокс и Удворда нами определялась активность 1) культуральной жидкости, отделенной от бактерий центрифугированием, 2) вытяжки, извлеченной из осадка *I* нейтральным фосфатным буфером, 3) спиртового экстракта из осадка *I*.

При этом оказалось, что культуральная жидкость и буферная вытяжка осадка *I* высоко активны в отношении грам-положительных кокков, в то время как спиртовый экстракт из осадка *I* совершенно не активен.

Таким образом, мы имеем основание считать, что в данном случае не происходит перехода активного начала из воднорастворимого, связанного с белком комплекса в спирторастворимую, свободную от белка форму.

Повидимому, штамм грамицидинобразующей палочки может претерпевать изменения, при которых связь тиротрицина с белковым комплексом становится более стабильной.

Напрашивалась мысль, что появление связанных бактериостатических веществ, не экстрагируемых спиртом из бактериальной массы и осажденного белкового комплекса, составляющих осадок *I*, зависит от недостаточно активного аутолиза бактериальных клеток.

Ввиду этого были предприняты попытки перевести бактериостатические вещества из связанной формы в свободную, — с одной стороны, путем плазмолиза бактериальных клеток толуолом, с другой стороны, путем воздействия протеолитических ферментов (трипсина) на осадок.

В опытах с плазмолизом к пятидневной культуре штамма 1 *а* добавлялся толуол из расчета 10 см³ на 1 л, смесь энергично встряхивалась и оставлялась в термостате еще на одни сутки. После этого обычным способом проводилось выделение бактерицидных фракций и испытание их активности.

Результаты опытов показали, что культуральная жидкость и буферная вытяжка из осадка *I* активны так же, как и в контроле, не обработанном толуолом, но освобождение спирторастворимой фракции, несмотря на плазмолиз, не происходит, и спиртовый экстракт не активен.

Для опытов с трипсином были применены осадки *I* после обработки их спиртом, давшие неактивные спиртовые экстракты.

К 1,6 г сухого остатка осадка *I* добавлялось 0,3 г трипсина и 50 см² 0,4% раствора бикарбоната натрия.

Проба инкубировалась в течение 48 час. при 37°. После инкубации жидкость фильтровалась; к прозрачному фильтрату добавлялась концентрированная соляная кислота до pH=4, 5. Выпадал хлопьевидный осадок. Последний собирался на фильтре и экстрагировался в 40 см³ спирта. Спиртовый экстракт испытывался вышеописанным методом на активность и на способность тормозить глюкозо-дегидразу; 0,02 см³ такого раствора полностью тормозят рост кокков, и их глюкозодегидразу, в то время как 0,2 см³ спиртового экстракта из такого же осадка, но без воздействия трипсина, никакого тормозящего влияния на рост кокков и на дегидрирование глюкозы не оказывали.

Во всех случаях изменения штамма спороносной палочки в направлении образования тиротрицина, стабильно связанного с бактерийным белком и не экстрагирующегося в силу этого спиртом, трипсин разрушал этот комплекс.

От каких изменений внешней среды зависит эта стабилизация связи активного начала с белком, нам установить не удалось.

Мы пытались снять вышеописанное превращение штамма повышением температуры инкубирования. В течение 6 дней культуры росли при t°=

=40°. Таким образом, нами были выращены посевы восьми серий. Ни в одной из них мы не наблюдали вышеуказанного изменения микробных клеток. Повидимому, повышение температур инкубации препятствует образованию стабильного комплекса тиротрицина с белковой молекулой.

Наши штаммы (12_1 и 1_a), так же как и штамм BG, описанный Дюбо, в отличие от штаммов Стокс и Удворда уже в первые дни роста бактерий основное количество активного начала выделяли в культуральную жидкость. При исследовании изменения бактерицидной активности культуральной жидкости штаммов BG и 1_a во времени мы констатировали, что максимальная активность обоих штаммов достигается на 5—6-й день роста культуры. На 7-й день роста активность начинает снижаться и к 11-му дню полностью исчезает. Из культур 11- и 12-дневной давности мы выделяли осадки *I*, не обладающие никакой активностью.

Повидимому, в процессе обмена, связанного со старением бактерий, происходят какие-то изменения в культуральной среде, ведущие к инактивированию образовавшегося тиротрицина.

Нами были исследованы изменения азотистых фракций среды в связи с активностью культуральной жидкости за период 10 дней роста бактерий штамма BG.

На 20 матрасах, содержащих по 300 см³ мясопептонного бульона, засевалась суточная культура штамм BG (5 см³). Матрасы инкубировались в термостате при 37°. Ежедневно в течение 10 дней для исследования брались два матраса, из них стерильно отбирались пробы для определения активности культуральной жидкости, затем их содержимое перемешивалось встряхиванием до образования равномерной взвеси. Часть культуральной жидкости центрифугировалась для отделения от тел бактерий, другая часть непосредственно бралась для определения pH и азотистых фракций. Нами определялись общий и остаточный азот путем сжигания по Кьельдалю с последующим определением NH_3 в чашках Конвэя; аммиак — по Конвэю, аминоазот — по Ван-Слайку.

Все фракции азота определялись в культуральной жидкости, содержащей бактерии, и в культуральной жидкости, из которой бактерии были удалены центрифугированием. Результаты исследования приведены в табл. 4—6.

Таблица 4

Бактериостатическая активность культуральной жидкости штамма BG в отношении золотистого стафилококка в зависимости от возраста культуры

Дни	Количество культуральной жидкости в см³ на 10 см³ среды				
	0,25	0,5	1	2	0 (контроль)
1	+	+	+	+	++++
2	+	+	—	—	++++
3	+	—	—	—	++++
4	+	—	—	—	++++
5	—	—	—	—	++++
6	—	—	—	—	++++
7	++	++	+++	+++	++++
8	++	++	+++	+++	++++
9	++	+++	+++	+++	++++
10	+++	+++	+++	+++	+++

Условные обозначения: + — интенсивный рост, — отсутствие роста.

Таблица 5

Изменение общего и остаточного азота (в мг %) культуры штамма BG в зависимости от возраста культуры

Возраст культуры по дням	*A*	*B*	*A—B*	*C*	*A—C*
1	844,4	789	55,4	772,8	71,6
2	868	812	56	817,6	50,4
3	—	—	—	—	—
4	875	812	63	784	91
5	868	812,4	55,6	828	40
6	884	834,4	49,6	817,6	66,4
7	856	828,8	27,2	851,2	4,8
8	844	810,6	33,4	827,6	16,4
9	862	834	28	851,2	4,8

Условные обозначения: *A* — общий азот культуры с телами бактерий; *B* — общий азот культуральной жидкости без бактерий; *C* — остаточный азот культуры с телами бактерий.

Таблица 6

Изменение азота аммиака (в мг %) культуры штамма BG в зависимости от возраста культуры

Дни	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Культуральная жидкость +бактерии	12,3	19	92	96,3	94,2	—	94	117	117	116	117
Культуральная жидкость	—	19,6	93	93,3	89,6	—	89,6	109	112	112	112

Таблица 7

Изменение азота аминокислот (в мг %) культуры штамма BG в зависимости от возраста культуры

Дни	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Культуральная жидкость+бактерии	111	104,4	100,8	105,1	99,7	108,3	102	83,5	90,4	83,5	83,5
Культуральная жидкость	—	104,4	100,8	100,1	99,7	105	99,7	79	85,8	83,5	83,5

Как видно из приведенных данных (табл. 3), активность культуральной жидкости увеличивается, начиная со второго дня роста, достигая максимума на 5—6-й день. На 7-й день активность культуральной жидкости начинает падать, почти полностью исчезая к 11-му дню.

pH культуральной жидкости к 4-му дню равна 8,5. На 5—6-й день равна 9—9,2. Первые три дня роста pH обычно ниже 8.

Общий азот культуральной жидкости бактерии и культуральной жидкости без тел бактерий в течение всех дней роста колеблется в пределе ошибки опыта, обусловленной отчасти тем, что для каждого исследования пробы брались из разных матрасов. Остаточный азот также не претерпевает изменений, выходящих за пределы ошибки метода. Общий азот бак-

териальных тел (*A—B*) и белковый азот культура (*A—C*) представляют незначительные величины по отношению ко всему азоту среды, поэтому определение этих фракций азота не может претендовать на большую точность. Можно все же отметить, что начиная с 7-го дня они снижаются.

Азот аммиака и аминокислот подвержен в процессе роста бактерий более значительным изменениям. С 1-го на 2-й день аммиак значительно увеличивается. Начиная со 2-го дня до 7-го количества аммиака не изменяются. Интересно отметить, что подщелачивание среды происходит именно в течение этого периода роста. Это дает основание предположить, что сдвиг реакции в щелочную сторону зависит не только от отщепления аммиака, а определяется, весьма вероятно, образованием аминов в результате декарбоксилирования аминокислот. С 6-го дня на 7-й количество аммиака вновь незначительно увеличивается и до 10-го дня держится на одном уровне.

Азот аминокислот в течение 6 дней от начала инкубации колеблется в пределах ошибки опыта, и только в первый день роста содержание аминоазота слегка падает по сравнению с содержанием его в культуральной среде до инкубации. На 7-й день роста культуры количество аминокислотного азота уменьшается и далее остается постоянным.

Сдвиги азотистых фракций, наступающие на 7-е сутки, совпадают со сроком начала падения активности культуральной жидкости и с одновременно наступающим снижением выхода сухого тиротрицина.

Выводы

Образование тиротрицина является частично функцией условий роста бактерий. Состав питательной среды влияет на выход тиротрицина.

Выход препарата тиротрицина зависит не только от количества образовавшегося в культуре тиротрицина, но и от характера связи между активным началом и бактериальным белком. При некоторых условиях связь эта может становиться более стабильной.

Трипсин разрушает стабильную связь тиротрицина с белком и тем самым способствует переходу активного начала в спиртовый раствор.

Совокупность сдвигов азотистых фракций культуры на протяжении ее развития сводится к следующему: на первые сутки отмечаются падение аминоазота и небольшой прирост аммиака, на вторые сутки — резкое увеличение содержания аммиака. Дальнейший период до шестых суток, т. е. период нарастания бактериостатической активности и накопления тиротрицина, не сопровождается сколько-нибудь существенными изменениями распределения азота по исследованным фракциям.

Падение активности и снижения выхода сухого тиротрицина, начинающееся с 7-го дня, совпадает во времени со вторичным подъемом азота аммиака и снижением аминоазота; с этого же дня падает азот бактериальных тел и белковый азот и соответственно увеличивается процентное содержание остаточного азота.

Лаборатория химии белкового обмена ВИЭМ
и Отдел биохимии микробов ВИЭМ
Москва

Получено 22. IV. 1944

ЛИТЕРАТУРА

1. Dubos R. I. J. Exp. Med. 70, 1, 249, 1939.
2. Dubos R. I. and Hotchkiss R., J. Exp. Med., 73, 629, 1941.
3. Halvor N., Christensen K. and Piersma H. D. J. Biol. Chem., 141, 187, 1941.
4. Hettche H. O. and Weter B. Arch. Hyg. Bakt., 123, 69, 1939.
5. Hotchkiss R. D. and Dubos R. I. J. Biol. Chem., 137, 791, 1940.
6. Hotchkiss R. D. and Dubos R. I., J. Biol. Chem., 136, 803, 1940.

7. Hotchkiss R. D. J. Biol. Chem., 141, 171, 1941.
8. Gordon T. C. and Haenseler C. M., Soil Sc., 47, 207, 1939.
9. Gordon, Biochem. J., 37, I, 1943.
10. Lipmann F., Hotchkiss R. and Dubos R. J. Biol. Chem., 141, 163, 1941.
11. Nicolle M. Ann. Inst. Pasteur, 21, 613, 1907.
12. Pringsheim E. G., CBI. Bakt. Abt, 51, 72, 1920.
13. Robinson H. I. and Groessle O., J. Pharm. and Exp. Therap., 76, 316, 1942.
14. Rosental L. C. R., 92, 78, 1925.
15. Stokes I. L. and Woodward C. K., J. Bact., 43, 253, 1942.

A CONTRIBUTION TO THE BIOCHEMISTRY OF THE SPORULATING GRAMICIDIN PRODUCING BACTERIA

A. S. Konikova, R. M. Asarkh, E. I. Blinnikova and *N. N. Dobbert*

Summary

The production of tyrothricin is in part a function of the conditions of bacterial growth. The composition of the nutritient medium affects the yield of tyrothricin.

The yield of the preparation depends not only on the amount of tyrothricin formed in the culture but also on the character of the bond between the active principle and the bacterial protein. Under certain conditions this may become more stable.

Trypsin destroys the stable bond between tyrothricin and the protein theredy increasing the amount of the active principle extracted by alcohol.

As to the changes undergone by the nitrogeneous fractions of the culture throughout development these are as follows; on the first day the amino-nitrogen content decreases and that of ammonia slightly increases while on the second day an abrupt increase of the latter takes place. The further period up the 6th day, *i. e.* that of increase of bacteriostatic activity and accumulation of tyrothricin, is not characterized by any appreciable changes in the distribution of nitrogen among the fractions in point.

The dorp of activity and of the yield of dry tyrothricin beginning with the 7th day coincides in time with the secondary rise of the ammonia a nitrogen and decrease of the amino-nitrogen. On the same day there begins also a drop of nitrogen of the microbe bodies and of the protein nitrogen while that of residual nitrogen increases.

Laboratory of Chemistry of Protein Metabolism
and Department of Biochemistry of Microbes of
Institute of Experimental Medicine
Moscow

ТЛИ — ПЕРЕНОСЧИКИ МОЗАИЧНОЙ БОЛЕЗНИ ЛУКА

А. М. Вовк

В 1936 и 1937 гг. Рыжков и Вовк в Харькове опытами по искусственному заражению соком и трансплантацией доказали инфекционность мозаичного заболевания лука. Болезнь эта очень вредоносна. Она вызывает подавление развития растений, стерильность и уродство соцветий, сильное снижение урожая луковиц и семян, а также понижение всхожести семян. Специальными опытами было установлено, что вирус зимует в луковицах [4]. В 1940 г. в Москве мы продолжили работу по изучению мозаичной болезни лука, поставив основной задачей выявление переносчиков болезни. В опытах по определению переносчиков мозаичной болезни лука участвовал ряд насекомых: тли, цикадки, клопы, трипсы и луковые ушки, однако детальное исследование было проведено только с тлями.

Предварительные испытания сборных видов клопиков, цикадок, трипсов, а также луковых мушек дали отрицательный результат. Виды указанных насекомых не определялись. Переносчиками мозаичной болезни лука оказались разные виды тлей: Myzodes persicae Sulz., Neomyzus circumflexus Back., Aulocorthum pelargonii Kalt. Работа проводилась в оранжерее, в условиях изоляции. M. persicae воспитывали на здоровых растениях тюльпана, табака и злаков, N. circumflexus — на здоровых лилиях, наконец, A. pelargonii — на здоровых гортензиях. Стерильные тли, выведенные на здоровых растениях тюльпана, лилии, гортензии, табака и злаков, испытывались отдельно по видам. Для этого применялись стеклянные трубки с открытыми концами, которые надевались на листья лука, а их отверстия закрывались ватой. Стерильные тли подсаживались по 10—20 шт. в трубку на листья больных растений, где они содержались от 2 до 5 суток. После этого инфицированные тли подсаживались на здоровые растения, на которых через 11 дней появлялись симптомы болезни на листьях в виде светлых точек, разрастающихся впоследствии в светлозеленые полоски. Таким образом, как и при заражении соком, в опытах с насекомыми инкубационный период болезни в растении равнялся 11 дням [4]. Опыты показали, что вирус мозаичной болезни лука легко переносится половозрелыми и личиночными формами тлей. Поражение лука мозаикой в отдельных опытах достигало 85%, в то время как на контрольном луке, на который тли не подсаживались, процент болезни равнялся 1,4, т. е. был в 60 с лишним раз меньше, чем при искусственном заражении. Заболевание лука отсутствовало при посадке стерильных тлей на здоровый лук без подкармливания их на мозаичном луке (табл. 1).

Данные, приведенные в табл. 1, получены в условиях изоляции. Однако в случае проведения опытов с переносчиками без изоляции на контрольном луке процент болезни может значительно повышаться, в то время как в опыте процент заболевания остается сходным с тем, который наблюдается в условиях изоляции. Например, из 39 растений, зараженных при помощи тлей, заболело 84,6%, а из 154 растений контрольного лука заболело 10,6%.

В опытах по перенесению мозаики лука тлями была подтверждена инфекционность мозаичного заболевания лука.

То обстоятельство, что мозаичную болезнь лука передают разные виды тлей; показывает, что болезнь не имеет строго определенного насекомого-

Таблица 1

Название культуры	Вид внесенных тлей	Источник инфекции	Число растений в опыте	% заболевших
Лук	M. persicae	Подкормленные на мозаичном луке	20	85,0
»	M. persicae	Не подкормленные на мозаичном луке	50	0
»	N. circumflexus	Подкормленные на мозаичном луке	50	82,0
»	N. circumflexus	Не подкормленные на мозаичном луке	10	0
»	A. pelargonii	Подкормленные на мозаичном луке	10	50,0
Лук контрольный	—	—	212	1,4

переносчика. Поэтому можно предположить, что и другие, не испытанные нами виды тлей могут распространять болезнь.

В наших опытах было установлено, что достаточно одной тли N. circumflexus для передачи вируса мозаики лука на здоровое растение. В этих опытах было 20 растений лука, из которых заболело 15,0%. Из 75 растений контрольного лука заболело только 1,3%, причем тяжесть симптомов в проявлении болезни и инкубационный период в растении не изменялись при заражении одной тлей. Таким образом, подсадка на растение 10—20 тлей, подкормленных на больном растении лука, дает только больше гарантии на получение высокого процента болезни.

В литературе разными авторами отмечены подобные данные для ряда видов цикад и тлей — переносчиков вирусов [5, 6, 7, 8, 15].

Необходимо отметить, что для опытов по искусственному заражению мы употребляли мелкие луковицы (севок), которые в естественных условиях обычно бывают здоровыми или оказываются зараженными лишь в ничтожном проценте. Луковицы второго года обычно значительно сильнее заражены мозаичными заболеванием.

В полевых условиях на луке нам удалось зарегистрировать M. persisae, Acyrthosiphon pisi Kalt., Cicadula sexnotata Fall., Deltocephalus striatus L., Hemyia antiqua Meig. и разные виды клопов (не определены).

Тли M. persicae, собранные на хозяйственных посевах лука и подкормленные на мозаичных растениях после подсадки на здоровый лук, вызвали высокий процент болезни. Тли, взятые с мозаичных растений лука в поле и подсаженные на здоровый лук, также вызывали заболевание. Следовательно, и в естественных условиях тли распространяют заболевание на посевах лука.

В дальнейшем было важно выяснить распространение мозаики лука на других культурах. Особый интерес для нас представляли разные виды лилейных, так как, по данным американских авторов, вирус желтой карликовости лука поражает лилии и нарциссы [9, 12].

В 1940 г. в Москве при обследовании цветоводческих оранжерей Треста зеленого насаждения мы обнаружили в большом проценте мозаичное заболевание на лилии, гиацинте и нарциссе.

Неоднократные наши попытки перенести при помощи тлей (M. persicae, N. circumflexus) и соком мозаичное заболевание лилий, гиацинта и нарцисса на здоровый лук не увенчались успехом. Это показывает, что мозаичность, обнаруженная на лилиях, гиацинте и нарциссе, не идентична вирусу мозаики лука.

Как известно, на луке нередко встречается огуречный вирус, Cucumis virus 1 Doolittle, причем температура инактивации последнего такая

же, как для вируса мозаики лука. Поэтому, чтобы выяснить вопрос, не вызывается ли мозаичная болезнь лука огуречным вирусом, мы провели опыты по перенесению мозаики лука тлями (M. persicae, N. circumflexus) и соком на проростки огурцов и при помощи и сока на проростки Vigna sinensis. Огуречный вирус на листьях у Vigna sinensis обычно вызывает только некрозы [7].

В опытах по заражению тлями и соком удалось установить, что мозаика лука не вызывает заболевания огурца и у Vigna sinensis. Следовательно, она не идентична огуречной мозаике.

Отрицательный результат был получен также при попытках перенести при помощи тлей и сока мозаичную болезнь лука на табак, помидоры и злаки.

* * *

В Америке и Европе известен целый ряд вирусов, поражающих лилейные [5, 6, 7, 9, 13, 14].

В Америке широко распространено вирусное заболевание лука, известное под названием желтой карликовости (yellow dwarf), а по номенклатуре K. Smith Allium virus 1 Melhus [14]. В 1926 г. Melhus и Henderson впервые наблюдали желтую карликовость лука. В 1928 г. Melhus, Reddy, Henderson и Vestal отметили в штате Иова сильное распространение этого заболевания [12].

Вирус желтой карликовости передается соком и более чем 50 видами тлей. В отдельных случаях это заболевание было передано цикадкой (Cicadula sexnotata Fall.). Вирофорные тли в течение 3—4 дней утрачивают способность заражать растения. Вирус может вызывать заражение растений без прохождения инкубационного периода в организме тли. Зараженные растения проявляют симптомы болезни на 9—12-й день [10, 11, 13].

В 1937 г. Bremer в Германии описал заболевание лука, которое он отождествляет с желтой карликовостью, известной в Америке. Он установил, что это заболевание может быть передано соком, тлями и трипсами [9].

В том же году появилось сообщение Рыжкова и Вовка, а также Андреева о существовании в СССР вирусного заболевания лука. Андреев относит это заболевание к желтой карликовости, известной в Америке, тогда как Рыжков и Вовк, описывая, по всей вероятности, то же заболевание, что и Андреев, устанавливают различие в свойствах вируса и в симптомах между заболеваниями лука, известными в Америке и в СССР [1, 4]. Следует отметить, что описанное в Германии Bremer'ом заболевание лука, судя по картине болезни, также, повидимому, является не желтой карликовостью, а представляет собой мозаичную болезнь, идентичную мозаичной болезни, распространенной в СССР.

То обстоятельство, что желтая карликовость и мозаичная болезнь лука, известная в СССР и в Германии, передаются соком и тлями, а также не имеют строго определенного вида насекомого-переносчика, дает возможность предполагать, что эти вирусы передаются насекомыми-переносчиками механически.

Полученные результаты создают предпосылки для борьбы с мозаичным заболеванием лука. В полевых условиях источником заражения лука из семян служат растения 2-го и 3-го года, которые являются резервуаром вируса и от которых вирус переносится тлями на лук 1-го года, а также на здоровые растения 2-го и 3-го года. Можно рекомендовать пространственную изоляцию семенных посадок лука от посевов лука 1-го года, борьбу с тлями, переносчиками мозаичного заболевания, а также отбор для посадки луковиц здоровых растений.

Из литературы известно, что хороший эффект в борьбе с тлями дает опрыскивание их анабазин-сульфатом или никотин-сульфатом [2].

Зараженность посадочного материала может быть испытана путем высадки до наступления вегетационного периода пробных луковиц в оранжерее, теплице или парниках и наблюдения за развивающимися растениями. При помощи предварительного испытания пробных партий луковиц можно определить, имеет ли хозяйство слабо или сильно зараженный посадочный материал. В полевых условиях невозможно точно определить степень зараженности лука, так как мозаика лука в очень большом проценте маскируется. Однако тщательная браковка луковиц мозаичных растений тоже может сильно уменьшить распространение болезни. Кроме того, необходимо избегать при посадке лука поля, где предшественником был лук, так как оставшиеся больные луковицы после уборки перезимовывают и могут служить источником инфекции.

В селекционных целях для отбора здоровых луковиц можно пользоваться индексированием луковиц, по аналогии со способом, применяемым в практике американского картофелеводства [6].

В селекционном отношении большой интерес представляют многолетние луки «Слезун» и «Бутун». Обследование хозяйственных посевов этих луков на опытной огородной станции в Алексеевке показало, что они имели не выше 1% мозаичной болезни, тогда как рядом расположенные посевы разных сортов репчатого лука поражались до 34%.

По данным Кривенко, гибриды, полученные им от скрещивани многолетних луков (Allium fistulosum и A. altaicum) с обычным двухлетним репчатым, являются более зимостойкими и урожайными, чем репчатый лук [3]. Было бы интересно выяснить устойчивость гибридов к мозаике лука. После выяснения переносчика болезни работа селекционера по выведению устойчивых сортов лука к вирусу мозаики облегчается. Дальнейшая разработка мер борьбы с мозаичной болезнью лука должна итти в направлении мероприятий по уничтожению насекомых-переносчиков, а также выведения устойчивых к мозаике сортов.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 3. III. 1944

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев Н. И. Новая для Союза вирусная болезнь лука. Азово-Черноморск. с.-х. ин-т, научно-исслед. работ, № 5, 1937.
2. Ефимов и Казас. Инсектиды и фунгициды. Сельхозгиз, 1940.
3. Кривенко. Межвидовые скрещивания луков (Allium L.). Биол. журн., т. VI, вып. 3, 1937.
4. Рыжков В. Л. и Вовк А. М. Новое заболевание лука, ДАН, т. XIV, № 1, 1937.
5. Рыжков В. Л. Вирусные болезни растений. Общая и частная вирология. Москва, 1935.
6. Рыжков В. Л. Информационный бюллетень новой литературы по вирусным болезням растений, № 1—4 за 1938 и 1939 гг.
7. Рыжков В. Л. Природа фильтрующегося вируса и вирусных болезней растений. Изд. АН СССР, 1939.
8. Сухов К. С. Вирусы растений и насекомые-переносчики. Изд. АН СССР, 1942.
9. Bremer H. Ueber die bisher fälschlich «Zwiebelrotz» genannte Gelbstreifigkeit an Zwiebelsamenträgern. Phyt. Z., B. X, H. I, 1937.
10. Drake C. J., Tate H. D. a. Harris H. M. The relationship of aphids to the transmission of yellow dwarf of onions. J. Econ. Entom., v. XXVI, 4, 1933 (цит. по The Riv. Appl. Mycol., v. XIII, p. I, 1934).
11. Drake C. J., Harris H. M. a. Tate H. D. Insects as vectors of yellow dward of onions. Science, 75, 1932, 341.
12. Melhus J., E. Reddy C. S., Henderson W. J. a. Vest [illegible] E. A new virus disease epidemic on onions. Phyt., v. XIX, 1929.
13. Smith K. M. A textbook of plant virus disease, 1937.

THE APHIDAE AS VECTORS OF THE MOSAIC DISEASE ON ONION

A. M. Vovk

Summary

1. The mosaic disease of onion detected in the USSR is not identical with the virus of yellow dwarf known in America (Allium virus 1 Melhus).

In distinction to the latter the former does not pass through the bacterial filter if affects the inflorescentia is inactivated at 65°—70° and retains its activity in the juice only 12 hours.

2. Different Aphidae disseminate the mosaic disease of the onion there are Myzodus persicae Sulz., Neomyzus circumflexus Back., Aulocorthum pelargonii Kalt.

3. This virus is transmitted by the Aphidae much easier and in higher per cent than through the juice or transplantation.

4. For combating disease the following may be recommended: spatial isolation of the seed plantings from first year onion plantings extermination of the Aphidae which disseminate the disease as well as selection of the bulbs of healthy plants for plating.

Institute of Microbiology of the
Academy of Sciences of the USSR
Moscow

Ответственный редактор *Б. Л. Исаченко*

Подписано к печати 17/VII 1944 г. Объем 3³/₄ печ. л. 5,8 уч.-изд. л. Л60165. Тираж 2000 экз. Цена 8 руб. Заказ № 1362.

1-я Образцовая типография треста «Полиграфкнига» Огиза при СНК РСФСР, Москва, Валовая, 28.

СОДЕРЖАНИЕ

И. Л. Работнова. Влияние внешних условий на уксуснокислое брожение 125

А. А. Имшенецкий и Л. Г. Логинова. Адаптация дрожжей к повышенной температуре 136

Н. А. Красильников. Бактериальная масса ризосферы растений 144

С. А. Эфендиева. Установление засоленности почв при помощи азотобактерной пробы 147

Ф. М. Билянский. О микрофлоре специй 155

В. Т. Панасенко. Экология плесневых грибов 158

А. С. Коникова, Р. М. Азарх, Е. И. Блинникова и Н. Н. Доббэрт. К биохимической характеристике спороносных бактерий, образующих грамицидин 171

А. М. Вовк. Тли — переносчики мозаичной болезни лука 180

CONTENTS

I. L. Rabotnova. The effect of external conditions on acetic fermentation 135

A. A. Imšenecki and L. G. Loginova. Adaptation of yeast to high temperature 143

N. A. Krassilnikov. The bacterial mass of the rhizosphere of plants 146

S. A. Efendieva. The determination of the salt content of soils by means of the Azotobacter test . . . 154

F. M. Bilyansky. Thermicroorganism of spices. 157

V. T. Panassenko. The ecology of molds 169

A. S. Konikova, R. M. Asarkh E. I. Blinnikova and N. N. Dobbert. A contribution to the biochemistry of the sporulating gramicidin producing bacteria 179

A. M. Vovk. The Aphidae as vectorš of the mosaic disease on onion 184

Цена 8 руб.